

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: 3901R032 Biomedicínská technika

Studijní obor: B3944 Biomedicínská technika

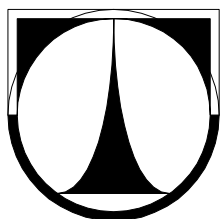
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Využití modifikovaných nanoprášků a nanovláken v medicíně

Utilization of modified nanopowders and nanofibres in medicine

Ivana Veverková

2011



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: 3901R032 Biomedicínská technika

Studijní obor: B3944 Biomedicínská technika

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: prof. RNDr. David Lukáš, CSc.

Konzultant: Ing. Petr Mikeš

Institute: Technická univerzita v Liberci
Studentská 2
461 17 Liberec 1

Počet stran: 71

Počet obrázků: 20

Počet tabulek: 3

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ivana VEVERKOVÁ**
Osobní číslo: **Z08000012**
Studijní program: **B3944 Biomedicínská technika**
Studijní obor: **Biomedicínská technika**
Název tématu: **Využití modifikovaných nanoprášků a nanovláken v medicíně**
Zadávací katedra: **Ústav zdravotnických studií**

Z á s a d y p r o v ý p r a c o v á n í :

- 1) V zpracování řešerše na dané téma
- 2) Navrhněte technologický postup pro výrobu nanokapslí a modifikovaných nanovláken
- 3) Provést experimenty na daném zařízení
- 4) analyzujte výsledky

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

50-70 stran

Forma zpracování bakalářské práce:

tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

RENEKER, D.H.; FONG, H. Polymeric nanofibers. American Chemical Society, Washington, DC, 2006.

LUKÁŠ, D.; SARKAR, A.; MARTINOVÁ L.; VODSEĎÁLKOVÁ, K.; LUBASOVÁ, D.; CHALOUPEK, J.; POKORNÝ, P.; MIKEŠ, P.; CHVOJKA, J.; KOMÁREK, M. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century), Textile Progress. Taylor & Francis, Vol. 41, No2, 2009, 59-140, ISBN – 13: 978-0-415-55823-5.

RENEKER, D.H.; YARIN, A.L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. Polymer 49, 2008, 2387-2425.

WNEK, G.E.; BOWLIN, G. L. Biomaterials and Biomedical Engineering. Marcel Dekker, Inc., New York, 2004.

BETAGERI, G.V.; JENKINS, S. A.; PARSONS, D. L. Liposome drug delivery systems. A Technomic Publication Company, Pennsylvania, USA, 1993.

Vedoucí bakalářské práce:

prof. RNDr. David Lukáš, CSc.

Katedra netkaných textilií

Datum zadání bakalářské práce: **30. dubna 2010**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2011**

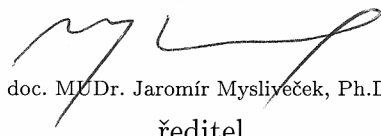
prof. Dr. Ing. Zdeněk Kůs
rektor



L.S.



doc. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D.
ředitel



V Liberci dne 30. listopadu 2010



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Ústav zdravotnických studií

461 17 Liberec 1, Studentská 2

Tel.: 485 353 722 Fax: 485 353 721

Studentka

Ivana VEVERKOVÁ

Z08000012

Nový Svět 530

512 46 Harrachov

Vyřizuje: M.Málková/485 353 724

V Liberci dne 22.03.2011

č.j.: 11/8518/0179-02

Vyjádření k žádosti o upravení zadání bakalářské práce

Vážená studentko,

na základě Vaší žádosti ze dne 16.03.2011, zaevidované pod č.j.: 11/8518/0179-01, v níž žádáte o upravení zadání, Vám sděluji, že **souhlasím** se změnou zadání a zásad pro vypracování bakalářské práce.

S pozdravem

doc. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D.
ředitel

Věc: Změna zadání bakalářské práce

Jméno a příjmení studenta: Ivana VEVERKOVÁ
Osobní číslo: Z08000012
Studijní program: Biomedicínská technika
Studijní obor: BMT
Stávající název tématu: Využití modifikovaných nanoprášků a nanovláken v medicíně

Zdůvodnění:

Vzhledem k vývoji moderních technologií a využití nanovláken v medicíně se ukázala enkapsulace v současné době jako velmi obtížná a málo uplatnitelná metoda. Došlo k posunu v oblasti inkorporace nanočástic a vývoji jiných a jednodušších metod. Navrhuji proto změnu zásad pro vypracování BP následovně:

- 1) Vypracování rešerše na téma použití nanovláken v medicíně
- 2) Navrhněte a zrealizujte postup pro výrobu agarových nanovláken
- 3) Navrhněte a realizujte postup pro inkorporaci nanočástic do nanovláken pro antibakteriální účinky.

Návrh vypracoval:



Prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
KNT TUL
vedoucí BP

V Liberci dne 15. března 2011

ŽÁDOST

Jméno : IVANA VEVERKOVÁ
Ročník : 3. Osobní číslo : 208000012 Datum narození : 4.4.1989
Studijní obor : BIOMEDICÍNSKÁ TECHNIKA Prezenční studium* / Kombinované studium*
Adresa trvalého bydliště : NOVÝ SVĚT 530, HAPRACHOV 512 46
Číslo telefonu : 736207283 E-mail : veverkovaivana@seznam.cz

Odůvodnění

Žádám o upravení zadání bakalářské práce. Z důvodu rychlého a stále ještě nepřehledného vývoje výroby nanovlákených struktur a jejich modifikací byly cíle mé bakalářské práce shledány jako velmi obtížné a málo uplatnitelné. Má práce je směřována k vývoji a testování nových druhů nanovláken a jejich modifikací, které by v budoucnu mohly být uplatňovány ve zdravotnictví. Přikládám žádost od vedoucího práce a stávající zadání.

V Liberci; 16.3.2011
datum

Ivana Veverková
podpis studenta

Prohlašuji, že jsem pravdivě vyplnil/a veškeré údaje.

VYJADŘENÍ ÚSTAVU

Rozhodnutí ředitele:

Hublanc

17.3.2011

[Signature]

Rozhodnutí rektora:

*) nehodící se škrtněte

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL. V tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

Datum: 20.4.2011

Podpis: *Irena Kovářová*

Anotace

Práce se v teoretické části zabývá tzv. tkáňovým inženýrstvím jako eventuelním způsobem léčby a náhrady poškozených tkání. Jsou zde shrnuta jistá specifika týkající se rozdílných typů lidských tkání, jejich potenciály jdoucí shodně či proti možnostem mechanické konstrukce biologických struktur.

V praktické části je představen konkrétní nanovláknenný materiál jako základ využitelný pro pokusy růstu a působení biologického materiálu. Na této struktuře by pak dále mohlo probíhat testování působení různých antibakteriálních složek inkorporovaných do struktury nebo aplikovaných zevně.

Klíčová slova: Tkáňové inženýrství, elektrostatické zvlákňování, nanovláknna, nanočástice, agar.

Annotation

The essay deals with tissue engineering as a possibility of threatment and reparation of an injured tissues. There are summarized the specificities of different types of human tissues and their potencials, which could allow the mechanical engineering of biological structures, against problems in this process.

In the practical part, there is presented concrete material made from nanofibres as a base used for experiments regarding growth and agency of biologic material. On this structure, there can be tested various atibacterial subject, which are located on the surface or incorporated into fibres.

Keywords: Tissue engineering, electrospinning, nanofibres, nanoparticles, agar.

Poděkování

Ráda bych vyjádřila svůj vděk rodičům, kteří mi studium na TUL umožnili a po celou dobu studia mě plně podporovali. Děkuji konzultantovi Ing. Petru Mikešovi za vedení mé práce, za poskytnuté cenné informace a prostředky, a vedoucímu mé práce prof. RNDr. Davidu Lukášovi, CSc. za možnost nahlédnutí do celkové problematiky nanostruktur a jejich vývoje na TUL.

Obsah

Obsah	10
Seznam používaných zkratk.....	12
Přehled pojmů a definic	13
Úvod.....	15
<i>TEORETICKÁ ČÁST</i>	16
1 Nanovlákná	17
1.1 Elektrostatické zvlákňování	18
1.2 Polymery vhodné pro tkáňové inženýrství	20
1.2.1 Biodegradabilní polymery	20
1.2.2 Přírodní polymery	21
1.2.3 Syntetické polymery	22
2 Úvod do tkáňového inženýrství	25
3 Tkáňové inženýrství kosti a chrupavky	28
3.1 Typy vývoje scaffoldu pro kosti a chrupavku	29
3.2 Bioaktivní keramické materiály	30
4 Tkáňové inženýrství pokožky	32
4.1 Biomateriály.....	33
4.2 Dosavadní pokusy	35
4.3 Problémy současně dostupných kožních náhrad	35
5 Tkáňové inženýrství a dodávání léčiv	38
5.1 Využití nanočástic.....	38
5.2 Vývoj struktury	39
5.3 Konstruované scaffoldy řízeně uvolňující léčiva.....	40
5.4 Systémy dodávání látek v potencionálním zájmu tkáňového inženýrství	41
5.4.1 Kontinuální dodávání.....	41
5.4.2 On–off dodávání	42
<i>PRAKTICKÁ ČÁST</i>	44
6 Současný vývoj v oblasti nanovláken	45
6.1 Krytí ran užívané v České republice	45
6.1.1 Obvazy s alginátem.....	45
6.1.2 Alginátové obvazy se stříbrem	46
6.1.3 Antiseptická krytí.....	46

6.1.4	Vysoce savé materiály	46
6.1.5	Obvazy s aktivním uhlím	46
6.1.6	Hydrogely	46
7	Představení výzkumu	48
8	Materiály korespondující s výzkumem	49
8.1	Kvasinka pивní	49
8.2	Agar	49
8.2.1	Základní druhy agaru jako kultivační půdy	49
8.3	Poly-vinyl-alkohol (PVA).....	50
8.4	Antibakteriální materiály	51
8.4.1	Stříbro	51
8.4.2	Antibiotika	52
9	Příprava roztoku.....	53
9.1	Pracovní postup přípravy roztoku	54
10	Elektrostatické zvlákňování roztoků.....	55
10.1	Zvlákňování na válečku	56
10.1.1	Zvlákňování roztoku $r1$ na válečku	57
10.1.2	Zvlákňování roztoku $r4$ na válečku	57
10.1.3	Zvlákňování roztoku $r3$ na válečku	58
10.2	Zvlákňování na tyčce	59
11	Parametry vzorků	62
11.1	Viskozita	62
11.2	Povrchové napětí.....	63
	Závěr	65
	Seznam obrázků	66
	Seznam tabulek	67
	Zdroje literatury	68

Seznam používaných zkratek

3D	tří-rozměrný
CaO	oxid vápenatý
CO ₂	oxid uhličitý
ECM	extracelulární matrix
EVAc	kopolymer acetátu ethylen-vinyly
HA	hydroxyapatit
KNT	Katedra netkaných textilií
Na ₂ O	oxid sodný
nm	nanometr
P ₂ O ₅	oxid fosforečný
PCL	polykaprolakton
PEG	poly-ethylen-glykol
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
POE	poly-ortho-ester
SiO ₂	oxid křemičitý
TUL	Technická univerzita v Liberci
tzv.	takzvaně
UV	ultrafialové

Přehled pojmů a definic

- Aditivum* - látka přidávaná do výrobků ke zlepšení nebo jiné úpravě jejich vlastností; přísady.
- Adsorpce* - povrchové pohlcování.
- Alginát* - přípravek z mořských řas.
- Alifatické sloučeniny* - jsou organické sloučeniny, které jsou tvořeny atomy uhlíku propojenými do necyklických větvených nebo nevětvených řetězců.
- Anastomóza* - funkční spojení.
- Antigenní* - rozeznatelný imunitním systémem, působící jako antigen.
- Antiseptický* - ničící choroboplodné zárodky.
- Cytotoxický* - poškozující buňky.
- Diferenciace* - proces, v němž se buňky svou stavbou přizpůsobují umístění a úloze v organismu.
- Elektroda* - elektrický vodič v kontaktu s nekovovou částí elektrického obvodu (vakuum, prostorem naplněným plynem, elektrolytem apod.), jsou dva druhy – katoda (nese kladný náboj) a anoda (nese záporný náboj).
- Enkapsulace* - zapouzdření.
- Enzym* - makromolekula, která katalyzuje nebo urychluje chemickou reakci.

Exsudace - pronikání tekutiny z cév při jejich zvýšené propustnosti, zejm. při zánětu či alergii.

Extracelulární matrix - mimobuněčná základní hmota.

Fibronektin – bílkovina obsažená v extracelulární hmotě, trombocytech aj.

Kolektor - plocha, na které jsou sbírána hotová nanovlákna, kolektorem je obvykle rovná kovová deska nebo mřížka, která může být pokryta textilií.

Molekulová hmotnost - přesněji molární hmotnost; je to fyzikální veličina udávající hmotnost jednotkového látkového množství dané látky, tedy hmotnost 1 molu; jednotka je $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Konformace - termín označující různá uspořádání molekul jedné sloučeniny.

Mutagenita - schopnost látky při působení na organismus vyvolat mutaci.

Proliferace - bujení, hojné množení.

Proteolýza – rozložení bílkovin na menší části peptidy a na aminokyseliny, které se využívají k tvorbě nových bílkovin nebo některých látek z aminokyselin vznikajících, či jako zdroj energie.

Teratogenní- způsobující vznik vrozených vývojových vad a defektů.

Viskozita - veličina charakterizující vnitřní tření, závisí především na přitažlivých silách mezi částicemi. Kapaliny s větší přitažlivou silou mají větší viskozitu, větší viskozita znamená větší brždění pohybu kapaliny nebo těles v kapalině.

Viskoelasticita - souvisí se schopností materiálů tlumit mechanické vibrace, při které dochází k částečné přeměně vložené mechanické energie v teplo. Jedná se o vnitřní tlumení materiálů.

Úvod

V současné době dochází k velmi invazivnímu průniku techniky a mechaniky do všech směrů lékařských oborů, počínaje od stále sofistikovanějších přístrojů úzce specializovaných pro lékařské využití, přes zdokonalování patientských prostředků standardizujících jejich komfort, konče hledáním způsobu mechanického nahrazení orgánů a jiných částí těla. V tomto směru jsou zaznamenány velké technické posuny. Jsou již běžně užívány například funkční náhrady končetin, dočasné náhrady srdeční funkce či dýchacího reflexu, funkce ledvin apod.

Právě zde postupně nacházejí uplatnění i nanovláknenné materiály. Nanovláknna skýtají obrovský potenciál využitelný v invazivním i neinvazivním lékařství, a to díky specifickému souboru vlastností. Z nich ty významnější jsou například velký specifický povrch, velmi malé průměry vláken a s tím korespondující mezery mezi vlákny, možnost inkorporovat do nanovláken nanočástice funkčních látek.

Obor, který v současnosti přitahuje pozornost jak lékařů, tak techniků a odborníků přes nanovláknna, je *tkáňové inženýrství*. Jeho cílem je pomocí nanovláken vytvořit plně funkční náhradu lidské tkáně, např. kosti, pokožky; v budoucnu se očekává i vývoj funkčních orgánů, jako jsou plíce či ledviny.

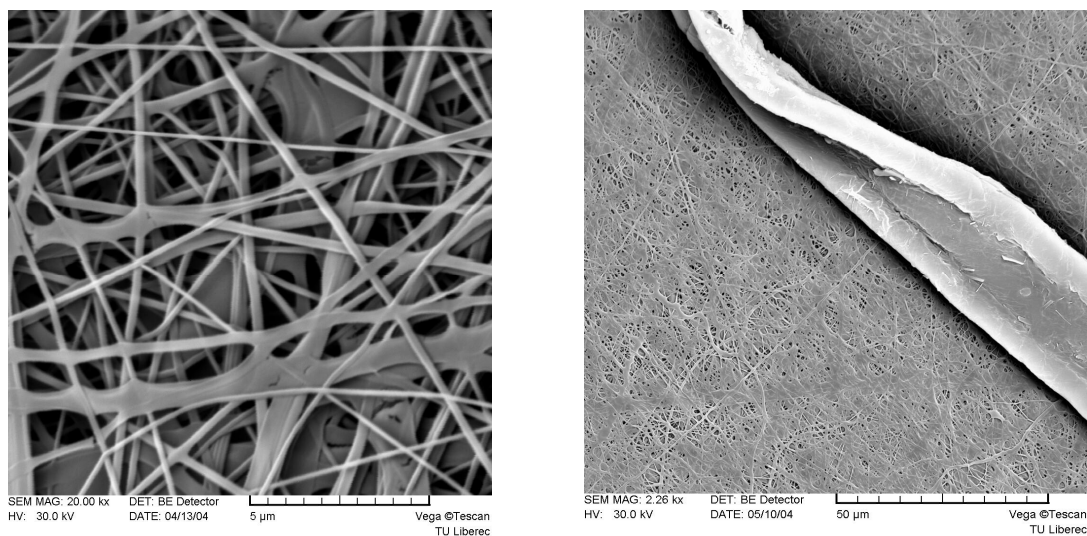
V práci jsou shrnuty dosavadní výsledky výzkumů a testů v tkáňovém inženýrství kostní tkáně a chrupavky, pokožky a v systému dodávání léčiv či podpůrných látek využitím tkáňového inženýrství.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Nanovláknna

Nanovláknna (Obr. 1) jsou vlákna o průměru menším než 1 μm , tedy vlákno o šířce několik desítek až tisíc atomů; to je důvod, proč jej lze pozorovat pouze elektronovým mikroskopem. Nanovláknna jsou vyráběna působením elektrostatického pole na povrch polymerního roztoku (polymer + rozpouštědlo) nebo polymerní taveniny. Vlastnosti nanovláken se liší v závislosti na množství složek při procesu výroby. V dnešní době jsou stále předmětem výzkumu a vývoje. Vlastnosti jsou dány hlavně zvoleným polymerem a přidáním prvku upravujícího určitý rys dle předchozího výzkumu či domněnky; dále jsou také ovlivněny například teplotou, vlhkostí a tlakem okolí při procesu výroby - zvláknování. Všechny tyto položky je nutné brát v potaz při porovnávání výsledného materiálu. [24]

Vlastnosti nanovláken jim předurčují širokou škálu aplikací. Rozsáhlou oblastí využití je právě medicína. Díky malým průměrům mohou být využitelné jako účinné bariérové a filtrační materiály, např. v ústenkách či rouškách, protože mezery mezi jednotlivými vlákny jsou tak malé, že jimi neprojdou bakterie, viry ani mikroby, mají obrovský specifický povrch. Dle výzkumů bude také možné využití nanovláken při hojení ran, vytváření náhrad orgánů člověka, tzv. tkáňové inženýrství. Další oblastí využití textilií je např. konfekce, zvuková izolace do automobilů, ale i jako nanoelektrická zařízení a vodíkové nádrže pro palivové články. [2]



Obr.1 – a) nanovláknna, b) nanovláknna v porovnání s bavlněným vláknem [40].

1.1 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je způsob výroby ultra jemných vláken z polymerního roztoku nebo taveniny pomocí elektrostatických sil. Tento způsob výroby se jako jediný zdá být schopen masové výroby jednotlivých kontinuálních nanovláken různých polymerů a tedy komerčně využitelný.

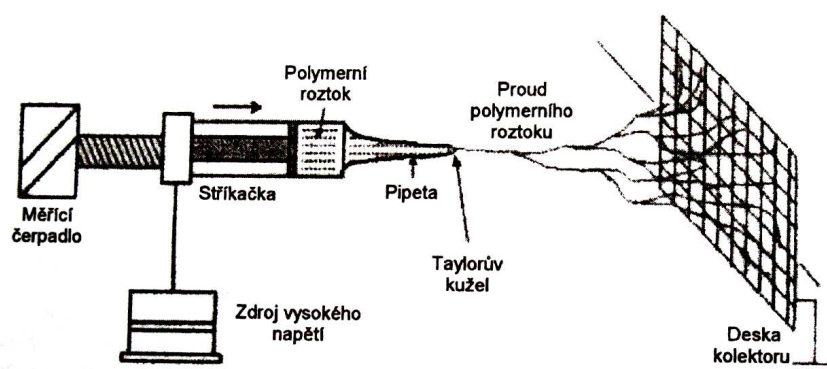
V procesu elektrostatického zvlákňování je využito vysoké napětí k vytvoření elektricky nabitého proudu polymerního roztoku nebo taveniny. Elektroda vysokého napětí je spojena přímo s polymerním roztokem. Roztok je následně zvlákněn kapilárou – zvlákňovací tryskou (Obr.2). Díky vysokému elektrickému napětí mezi špičkou kapiláry a uzemněným kolektorem vzniká tzv. Taylorův kužel (Obr.3) na špičce kapiláry. Následným zvýšením elektrického pole je dosaženo kritické hodnoty, při které odpudivá elektrostatická síla překoná povrchové napětí a ze špičky Taylorova kuželu je vypuzen nabitý proud kapaliny. Vytékající proud polymerního roztoku podstoupí nestability a proces prodlužování, což způsobí, že se proud stane velmi dlouhým a tenkým. Vláknina ztuhne po odpaření rozpouštědla a vytvoří vláknennou vrstvu na povrchu kolektoru. Nabitý proud se zrychluje a ztenčuje v elektrickém poli, nakonec narazí na uzemněnou protielektrodu kolektoru, na které se usadí. Za jistých podmínek se kapalinový proud stává nestabilním před dosažením kolektoru. U kapalin nízké molekulární hmotnosti má počátek nestability za následek spršku malých, nabitých kapiček v procesu známém jako elektrostatické rozprašování. Polymerní kapaliny jsou viskóznější a viskoelastické síly stabilizují proud, což dovoluje formaci nabitých vláken malého průměru, která ztuhnou a uloží se na kolektoru ve formě netkané textilie. [1]

Schopnost polymeru formovat se do vláken je označována jako *zvlákňovitost*. Je to soubor vlastností ovlivňující tuto schopnost. Doshi a Reneker klasifikovali parametry, které ovlivňují proces do částí vlastností roztoku, kontrolované proměnné, parametry okolí [3]. Běžněji užívané rozdělení je však na procesní a systémové parametry. Obě klasifikace zahrnují v podstatě stejné základní veličiny.

Mezi procesní charakteristiky ovlivňující tvorbu vláken patří elektrická vodivost a dielektrické vlastnosti polymerního roztoku, intenzita elektrického pole a elektrický

proud procesu, vzdálenost kolektoru od zvlákňovací trysky či kapiláry, parametry okolí (teplota, vlhkost).

Systémové parametry jsou především vlastnosti zvlákňovaného polymeru, jsou to molekulová hmotnost, distribuce molekulové hmotnosti, stavba polymeru (rozvětvený, lineární apod.), koncentrace polymerního roztoku, viskozita, hustota, povrchové napětí a viskoelastická roztoku, dále také teplota zvlákňování – ta je důležitá zejména při zvlákňování polymerních tavenin, rychlost odpařování rozpouštědla u roztoků a rychlost tuhnutí polymerní taveniny.[1]



Obr.2 – Schéma principu elektrostatického zvlákňování[1]

Metoda nazvaná Nanospider

Hlavní princip této metody spočívá v poznatku, že Taylorovy kužely je možné vytvořit i na tenké vrstvě polymerního roztoku. Vlákna jsou formována pomocí elektrostatického pole z tenké vrstvy a poté sebrána jako netkaná textilie na kolektoru. Průměr vláken se pohybuje v rozsahu 100 – 300 nm a plošná hmotnost nanovlákených vrstev je 0,1 – 5 g.m⁻². Produktivita této metody je podstatně vyšší v porovnání s ostatními.

Tento způsob přípravy nanovláken byl vyvinut na Katedře netkaných textilií Technické univerzity v Liberci a následně patentován. [1]

1.2 Polymery vhodné pro tkáňové inženýrství

Jak bylo řečeno výše, materiál pro výrobu nanovláken je polymerní roztok nebo polymerní tavenina. Polymer je látka sestávající se z molekul jednoho nebo více druhů atomů nebo skupin spojených navzájem ve velkém počtu. Mají řetězcovou strukturu. Aby byly polymery vhodné pro využití v lékařství, musí splňovat přísná kritéria, neboť dochází k jejich přímému kontaktu s živou tkání, tudíž nesmí tuto živou strukturu ohrozit. Hlavními požadavky na tyto polymery jsou biokompatibilita a biodegradabilita.

Biokompatibilita zahrnuje snášenlivost látek, zejména materiálů v biologickém prostředí. Biokompatibilní materiál se posuzuje podle interakce s prostředím, především podle cytotoxického působení, podle toxikologických a alergických reakcí, podle karcinogenních, teratogenních či mutagenních reakcí, podle vlivu na infekční procesy. Důležité je, aby materiál neovlivňoval například koagulace, nevyvolával zánětovou reakci, neuvolňoval potenciálně toxické látky [4]. Biokompatibilita produktů tkáňového inženýrství se týká jejich schopnosti podporovat příslušnou aktivitu, která zahrnuje podporu molekulárním a signálním systémům za účelem optimalizovat regeneraci tkáně. Nesmí při tom docházet k nežádoucím efektům v buňkách a nesmí být vyvolána nežádoucí lokální nebo systémová odezva. [6]

Biodegradace neboli biologický rozklad je proces, při kterém jsou organické látky odbourávány živými organismy. Organické materiály mohou degradovat aerobně – při působení kyslíku, nebo anaerobně – bez působení kyslíku. Biodegradace polymerních materiálů může probíhat několik týdnů i mnoho desítek let. Je při ní produkován CO_2 a voda. [4]

1.2.1 Biodegradabilní polymery

Komerčně dostupné biodegradabilní polymery klasifikujeme do tří tříd.

- **Přírodní polymery**
- **Syntetické polymery**

- **Modifikované biodegradabilní polymery**

Jsou modifikovány aditivy.

Biodegradabilní polymery produkované přirozenou cestou jsou obnovitelné. Některé syntetické polymery jsou obnovitelné také, jelikož jsou vyrobeny z obnovitelného výchozího produktu (např. kyselina polymléčná pochází z hospodářsky obnovitelného zdroje). [5]

Dále uvedu významné polymery z těchto kategorií.

1.2.2 Přírodní polymery

Jsou produkovány živými organismy. Proces rozkladu je katalýza za působení enzymů, která nastává ve vodném prostředí. Makromolekuly jako proteiny, celulóza a škrob jsou obecně náchylné k biodegradaci za působení hydrolytických enzymů mikroorganismů.

Do této kategorie patří modifikované polysacharidy, jako je například škrob, celulóza, kyselina hyaluronová či kolagen. V této skupině má výsadní postavení chitosan.

Chitosan

Chitosan je biosyntetický polysacharid, který je získáván deacetylací chitinu. Chitin je po celulóze druhý nejrozšířenější organický materiál, který je obsažen například ve schránkách koryšů, nebo je generován fermentačním procesem.

Chitosan není antigenní a je při implantaci dobře tolerovaným materiálem. Díky svému pozitivnímu náboji při fyziologickém pH je též bioadhezivem. Chitosan podporuje léčbu zranění a má bakteriostatický efekt.

Byly popsány různé aplikace chitosanu, jako využití v tkáňových krytech či kontrolovaném transportu léčiv. Také bylo zjištěno, že vlivem pozitivního náboje může působit na pevnost spojení mezi buňkami. Je prokázáno, jak velmi efektivně může být ovlivněn transport léčiv, zejména takových, která vykazují polární charakter.

Chitosan je zpracováván do membrán a maticí vhodných zejména pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Zpracování chitosanových matic je umožněno zejména díky využití vnitřních elektrostatických vlastností molekuly. Polymerní řetězce chitosanu jsou vzájemně poutány elektrostatickými interakčními silami mezi aminovými skupinami. S rostoucími iontovými silami se snižuje vzdálenost mezi řetězci, což ve svém důsledku zvyšuje počet vazných bodů mezi nimi a tím i tuhost matrice.

Chitosanová molekula je neutrální, ale vytváří intermolekulární vodíkové vazby, které ztěžují rozpustnost. Díky amino skupině na řetězci je chitosan dobře rozpustný ve vodných roztocích kyselin a po protonizaci aminové skupiny vykazuje vlastnosti kationaktivního polyelektrolytu.[5,6]

Kolagen

Kolagen je ve vodě nerozpustná bílkovina, je to základní stavební jednotka pojivových tkání, existuje přes 20 odlišných typů kolagenu. Kolagen vyskytující se v pokožce je převážně syntetizován fibroblasty a myofibroblasty, vyskytuje se zde ve formě vláken. Hlavní komponent hojení jizev pokožky je kolagen typu I.[9]

1.2.3 Syntetické polymery

Primárně polyestery. Jsou chemicky syntetizovány z biologických zdrojů, jako je cukr, škrob, přírodní tuky nebo oleje. Proces biodegradace je stejný jako u přirozeně degradabilních polymerů, tedy katalýza ve vodném prostředí za působení enzymů.

Kyselina polymléčná (PLA)

PLA je termoplastický, alifatický polyester odvozený z obnovitelných zdrojů. Běžné výchozí suroviny jsou kukuřičný škrob nebo cukrová řepa. Pro produkci PLA je využit proces fermentace. PLA se může vyskytovat ve třech formách – D, L a směs DL. Nejvhodnější pro využití v tkáňovém inženýrství je kyselina DL-polymléčná (PDLLA). Tento materiál má nižší pevnost v tahu, vyšší prodloužení a mnohem rychlejší čas degradace.

PLA je snadno zvláknitelná, v této formě má rozličné rysy, které ji předurčují ke spoustě potenciálních aplikací. Polymery PLA jsou výrazně hydrofilní, mají nízkou hustotu, vykazují nízkou vznětlivost. Srážení materiálů z PLA a termální spojování jsou snadno kontrolovatelnými procesy.

Díky těmto mechanickým vlastnostem nachází PLA široké pole využitelnosti v biomedicínských aplikacích. Je ideálním kandidátem na tvorbu scaffoldu pro kostní implantáty či štěpy měkké tkáně, stenty, chirurgické nitě pro vnitřní šití, dialyzační média. [5,6]

Kyselina polyglykolová (PGA)

PGA je nejjednodušší lineární alifatický polyester. Vysoký stupeň krystalinity, 45–55%, vede k obtížné rozpustnosti ve většině organických rozpouštědlech. Vlákná z PGA vynikají vysokou pevností a modulem. Stehy utvořené PGA ztrácejí asi 50 % pevnosti po dvou týdnech a 100 % pevnosti po čtyřech týdnech. K úplné absorpci dochází za tři až šest měsíců. Degradace PGA závisí na teplotě, pH, molekulové hmotnosti a na stupni krystalinity. Při expozici fyziologickým podmínkám degraduje náhodnou hydrolýzou. Tento proces může být urychlen určitými enzymy, zejména esterázovou účinností. Produktem degradace je netoxická kyselina glykolová, která následně vstupuje do metabolického cyklu kyseliny citronové. Část kyseliny glykolové je vyloučena močí. Z organismu je plně vyloučena během čtyř až šesti měsíců. [5,6]

Polykaprolakton (PCL)

PCL je termoplastický polymer získávaný chemickou syntézou surové nafty. Přestože není vyráběný z obnovitelných zdrojů, je plně biodegradabilní. Polykaprolakton je rezistentní vůči vodě, oleji i rozpouštědlu. Má nízkou teplotu tání (58-60°C) a nízkou viskozitu. Je jednoduše zpracovatelný. [51]

2 Úvod do tkáňového inženýrství

Tkáňové inženýrství je obor, který spojením vědy technické a přírodní usiluje o vývoj biologické struktury, která by měla převážně nahradit či podpořit poškozené tkáňové struktury. [27]

Jeden z aspektů tkáňového inženýrství je vývoj polymerní struktury, takzvaného scaffoldu (z angličtiny – lešení, zde tkáňový nosič) se specifickými mechanickými a biologickými vlastnostmi přizpůsobenými tak, aby negativně nepůsobily v původním prostředí extracelulárního matrixu (ECM). Tento scaffold má vykazovat stejné vlastnosti a chování jako okolní tkáň a buňky. [25]

Propojená komplexnost těchto prostorových a časových dynamických procesů mezi buňkou a ECM je prozatím stále v některých případech nejasná, což výzkum komplikuje. Ovšem známé druhy interakce mezi buňkou a ECM, jako například diferenciací, sekrece hormonů a růstových faktorů, exprese genu tvořícího buněčnou aktivitu, mohou být díky úspěšnému vpravení scaffoldu úplně obnoveny.

Scaffold funguje jako dočasná určitá tkáňová podpora, dokud se struktura sama nezotaví. Scaffold poskytuje 3D „trámcovou“ strukturu, na kterou se původní buňky navazují, poskytuje jim prostor pro vývoj a rozmnožování, podporuje tedy regeneraci a tkáňovou obnovu. Po čase se scaffold úplně rozpadne, jeho složky jsou organismem zpracovány, nepotřebné je vyloučeno. [26]

Ideální tkáňová náhrada by měla být mechanicky stabilní a schopná biologicky působit v místě implantace. Mechanická stabilita implantátu je primárně závislá na druhu biomateriálu, architektuře scaffoldu a vzájemné interakci s materiály okolních buněk. Biologická funkčnost je regulována biologickými procesy okolí, například signály růstových faktorů, ECM apod.

Důležitým aspektem původního ECM jsou jeho charakteristické částice lišící se většinou druhem tkáně, společný je například kolagen. To stanovuje vyvíjenému

scaffoldu kritéria, která musí být pro úspěšnost funkčnosti splněna. Nová součást lidského organismu musí co nejpřesněji, nejlépe absolutně, odpovídat původnímu prostředí, pro které je určena. Například aktivita osteoblastů a osteoklastů vzrůstá v závislosti na částicích kysličníku uhličitého, které připomínají krystaly hydroxyapatitu vykytujícího se v kostech. Nanovlákná struktura tedy musí také selektivně podporovat vývoj těchto buněk na uhlíkových vláknech.[28]

Scaffold musí vykazovat tyto základní vlastnosti:

- Trojrozměrná pórovitá struktura se vzájemně propojenými póry
- Biokompatibilita a biodegradabilita s kontrolovaným rozkladem trvajícím přibližně stejnou dobu jako růst dané buňky
- Chemicky kompatibilní povrch
- Mechanické vlastnosti odpovídající umístění implantátu
- Nesmí vyvolávat nežádoucí systémové odezvy (záněty apod.)

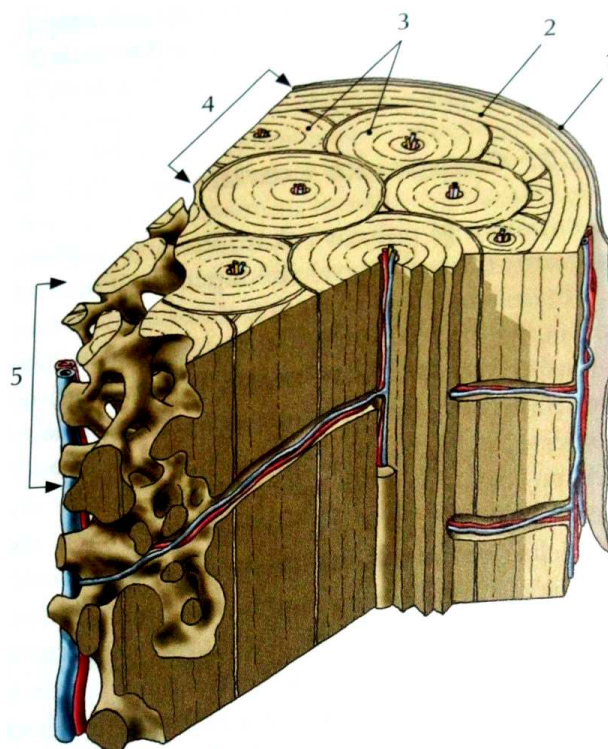
Tabulka 1 – Materiály využívané v tkáňovém inženýrství pro konstrukci scaffoldů [11]

Materiály		Vhodná aplikace
Přírodní	Kolagenové scaffoldy	Náhrada měkkých tkání
		Diferenciace buněk
		Konstruování kapilár
		Konstruování kožní vrstvy
		Vaskularizace tukové tkáně
	Kyselina hyaluronová a její deriváty	Regenerace pokožky, chrupavky
		Podpora růstu buněk
	Gely z kyseliny hyaluronové a kolagenu	Regulace růstu cév
	Chitosan	Konstrukce chrupavky
		Chitosanové propojené scaffoldy
	Fibrin	Konstrukce cév
		Uvolňování fibroblastů
Syntetické	Kyselina polyglykolová	Konstrukce muskuloskeletální tkáně
	Kyselina polymléčná	Regenerace chrupavky
	Kopolymer kys. mléčné a glykolové	Konstrukce fibrovaskulární tkáně
	Polykaprolakton	Konstrukce pokožky
Anorganické	Polyethylenglykol	Formování kosti
	Trikalciumfosfát	Kostní náhrada
	Hydroxyapatit	
Polosyntetické	Kyselina hyaluronová se sírou	Růst a podpora neuritů
		Regenerace hlasivek
	Esterifikovaný hyaluronan	Konstrukce chrupavek

3 Tkáňové inženýrství kosti a chrupavky

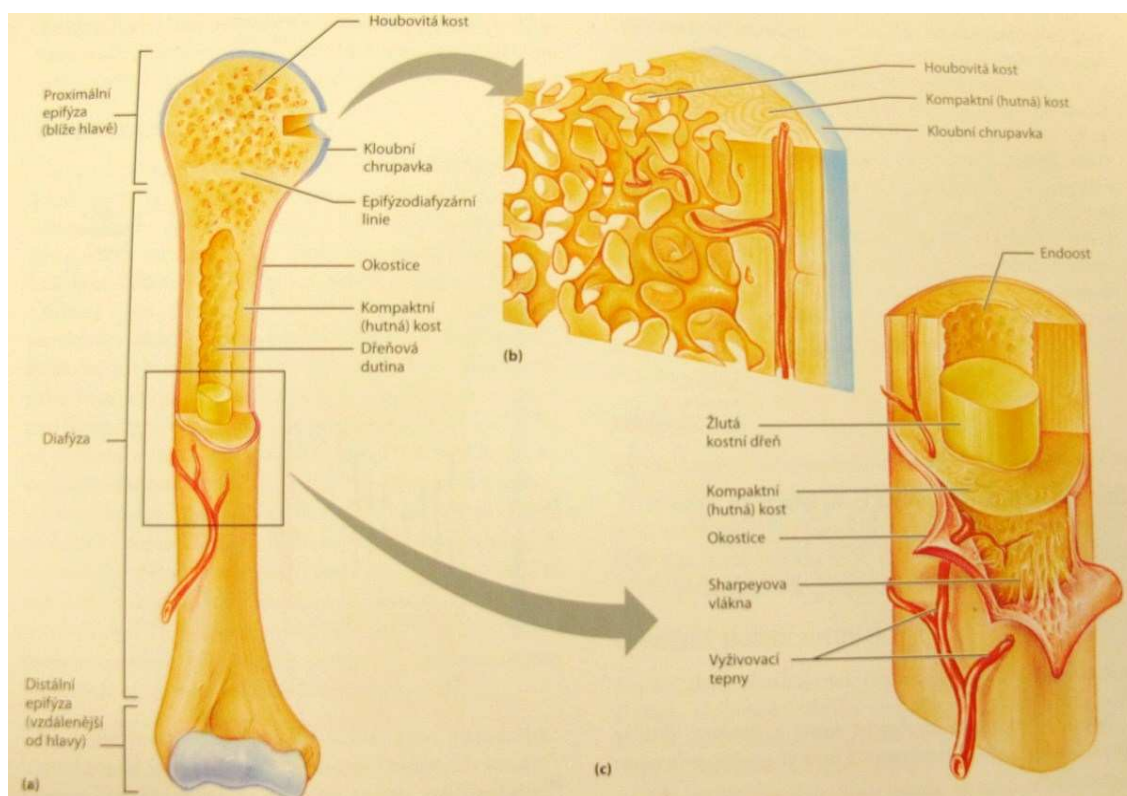
Regenerace kosti (Obr.3, Obr.4) a chrupavky pomocí autogenní transplantace je jednou z nejvýznamnějších oblastí, na kterou je tkáňové inženýrství zaměřeno. Léčba tímto způsobem významně eliminuje problémy s dárcovstvím, což je problém kvalitativní stejně jako kvantitativní. [29]

Osteoblasty, chondrocyty a mezenchymální kmenové buňky získané z pacientovy měkké a tvrdé tkáně jsou expandovány v živné kultuře a vsazeny do scaffoldu, kde se pomalu vyvíjejí a rostou in vivo nebo in vitro. Materiály zkoumané speciálně pro tkáňové inženýrství chrupavky a kosti jsou hydroxyapatit, poly(α -hydroxyestery), z přírodních materiálů pak kolagen a chitin. Další významnou kategorií materiálu jsou bioaktivní keramické látky, kterými se budu zabývat níže. [27]



Obr.3 – Schéma stavby kosti [39]

1 – periost, 2 – povrchové kostní lamely, 3 – osteony, 4 – kompaktní kost, 5 – spongiózní kost.



Obr.4 – Kostní tkáň [39].

3.1 Typy vývoje scaffoldu pro kosti a chrupavku

V oblasti výzkumu scaffoldů pro náhradu kostí a chrupavek byly prozatím stanoveny dva typy vývoje.

Strategie I

První metoda vychází ze skutečnosti, že fyzický scaffold podporuje tkáňový růst v časovém rozmezí od aplikace buněk do struktury k bodu, kdy je implantát remodelovaný hostitelskými buňkami. V případě nosné tkáně, jako je například kloubová chrupavka či kost, musí scaffold vykazovat další nutnou vlastnost – musí sloužit jako dočasná adekvátní mechanická podpora odolávající napětí a zátěži. Výzkum klade důraz na materiál v tom, že musí být vybrán a vytvořen se správným poměrem degradace a resorpce tak, že pevnost scaffoldu je udržována, dokud není tkáňový transplantát plně remodelován hostitelskou tkání a může zaujmout svoji nosnou roli.

Přeměna kosti *in vivo* je zatížena speciálním požadavkem, a to že degradační a resorpční procesy musí být předem řízeny tak, aby si scaffold své vlastnosti udržel právě po dobu šesti měsíců (4 měsíce pro vývoj buněk a 2 měsíce pro ustálení daného stádia). Poté by měla začít struktura ztrácet své mechanické vlastnosti a měla by být metabolizována organismem bez negativních vedlejších účinků v čase 12-18 měsíců od implantace. Opět je nutné zdůraznit, že kompletní vlastnosti scaffoldu v době vpravení do organismu by měly odpovídat hostitelské tkáni tak přesně, jak je to možné. [7,30]

Strategie II

Druhá metoda považuje za podstatnou strukturu matice scaffoldu, ve které probíhá buněčná proliferace a diferenciací až do fáze, kdy je raná kost nebo chrupavka umístěna do organismu. Degradaci a resorpční působení scaffoldu je konstruováno tak, aby umožnilo aplikovaným buňkám proliferaci a sekreci jejich vlastního extracelulárního matrixu během statické a dynamické fáze usazování buněk (1.-12. týden), zatímco polymerní scaffold postupně mizí, čímž uvolňuje dostatečný prostor pro růst nových buněk a tkání. Fyzická podpora 3D scaffoldem je udržovaná, dokud má zkonstruovaná tkáň dostatečnou integritu nést sama sebe. [7]

3.2 Bioaktivní keramické materiály

Jak již bylo zmíněno, speciálně pro náhražky kosti a chrupavky jsou v současné době využívány bioaktivní keramické látky nebo sklo-keramické látky. Z těchto materiálů jsou vyráběny kloubní a kostní implantáty. Spojení polymeru a keramické látky je vyvíjeno za účelem zvýšení mechanické stability scaffoldu a zlepšení vzájemného působení s okolní tkání. Navíc je tento výzkum také směřován k možnosti dodávání léčiv do místa implantace.[8]

Základními prvky většiny bioaktivních skel jsou SiO_2 , Na_2O , CaO , a P_2O_5 . Například látka 45S5 Bioglasss obsahuje 45% SiO_2 , 24.5% Na_2O , 24.4% CaO a 6% P_2O_5 , ve váženém poměru.[31]

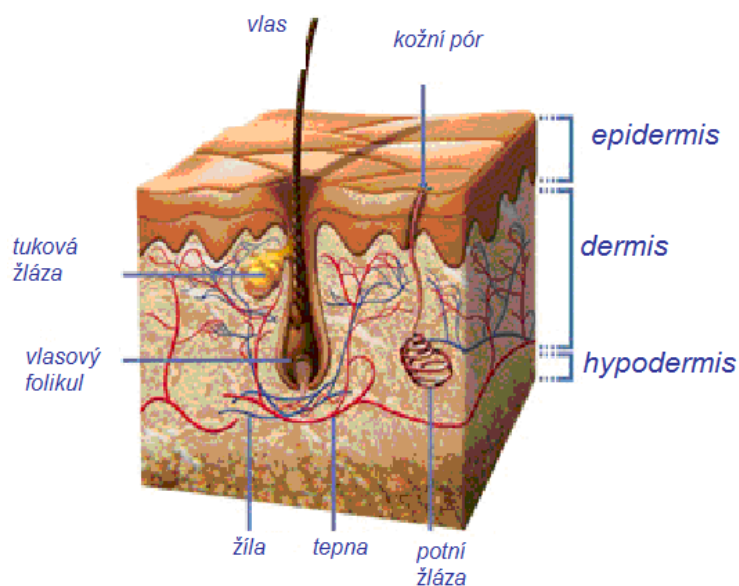
Běžná vlastnost bioaktivního skla a keramiky je časově závislá kinetická modifikace povrchu, která nastává po implantaci. Povrch této struktury je potažen vrstvou hydroxyapatitu (HA), sloučeninou vápníku a fosforu, který je významnou složkou tvrdých tkání kostí a zubů, například v zubní sklovině je obsažen hydroxyapatit s příměsí iontů fluoru. Hydroxyapatit v kombinaci s polymerními materiály (např. kolagenem) vykazuje na makroskopické i na mikroskopické úrovni strukturu podobnou kostem.[8]

Na povrchu vpravené náhražky je vytvářena vrstva biologicky aktivního hydroxyapatitu s příměsí uhlíku (HCA), která poslouží jako spojovací prvek s tkání. Skupenství HCA formulujícího se na implantátu je chemicky ekvivalentní s minerálním složením kosti. Velký význam pro užití bioaktivních skel v tkáňovém inženýrství je přikládán také zjištění, že podporují aktivitu enzymů [33], krevní zásobení, podporují růst osteoblastů, vyvolávají diferenciaci mezenchymálních buněk do osteoblastů [32]. Významným objevem v této sféře bylo, že produkty rozkladu bioaktivních skel, především 45S5 Bioglass, zvyšují exprese genu, který kontroluje osteogenezi a produkci růstového faktoru. [34]

4 Tkáňové inženýrství pokožky

V lidském organismu pokožka představuje přibližně desetinu lidské hmotnosti. V organismu zastává funkce ochranné bariéry proti vnějším vlivům jako jsou mechanické podněty, UV záření, patogenní mikroorganismy, dále funguje jako termoregulační vrstva a brání ztrátě tekutin. Její poškození jako trauma, popáleniny či chirurgické zákroky mívají vážné následky, a to jak ve směru ztráty funkčnosti, tak z estetického hlediska. Vývoj kožní náhrady představuje potenciální zdroj adekvátní léčebné metody akutních a chronických poškození pokožky. V současnosti nejsou prozatím vyvinuty žádné modely plně vystihující a nahrazující anatomii, fyziologii a biologickou stabilitu přirozené pokožky. [9]

Kožní náhrady musí vykazovat jisté specifické vlastnosti: musí být jednoduše aplikovatelné do místa poranění, poskytovat přirozenou ochranu s patřičnou propustností vody, má být lehce přilnavé, jako všechny tkáňové náhražky musí podléhat kontrolované degradaci, být sterilní, netoxický, nevyvolávat zánětlivé reakce. Navíc by spojení s hostitelskou tkání mělo proběhnout bezbolestně a s minimálním následným zjizvením. [10]



Obr.5 – Schéma pokožky [38].

4.1 Biomateriály pro tkáňové inženýrství pokožky

Specifickou položkou ve vývoji pokožkové náhrady je fakt, že musí být spolehlivou podporou do té doby, dokud se plně nevyvinou obě kožní vrstvy, pokožka i škára. Materiály užívané jako náhradní ECM doposud zahrnují přírodní materiály a jejich syntetické deriváty [35]. Příklady přírodních materiálů jsou polypeptidy, hydroxyapatity, hyaluronan, kolagen, chitosan. Ze syntetických materiálů se využívá například polyglykolid, polylaktid, které jsou užívané pro výrobu scaffoldu. Při tvorbě scaffoldu pro kožní náhrady již je užíváno metody elektrostatického zvlákňování.

Dále uvedu dvě nejčastěji užívané složky – kolagen a fibronectin.

Kolagen

Kolagen už je po nějaký čas užíván k rekonstrukci dermis, která podporuje spontánní vývoj sítě nahrazující lidskou kapilární strukturu [36]. Více viz kapitola 1.1.2 Přírodní polymery.

Fibronectin

Fibronektiny jsou velké přilnavé glykoproteiny. Vyskytují se na povrchu buněčných membrán, v mezibuněčné hmotě a volně v tělních tekutinách.

Existují dvě hlavní skupiny fibronektinů:

- rozpustný, plazmatický fibronectin („studený“) je důležitou složkou krevní plazmy, vyrábí ho hepatocyty v játrech
- nerozpustný, buněčný fibronectin je hlavní složkou extracelulárního matrixu, je vyráběn fibroblasty.

Fibronectin se může vázat na celou škálu biomolekul jako je kolagen, fibrin, heparin, DNA, aktin a podobně. Má širokou škálu funkcí, umožňuje buněčnou adhezi, hojení ran a udržování tvaru buněk.

Hydrogely

Jeden ze základních problémů s dostupností kožních náhrad je jejich sklon k vaskularizaci. Je známo, že působení fibronektinu způsobuje mechanické pnutí. Bylo prokázáno *in vivo* i *in vitro*, že fibrin podporuje růst keratinocytů a fibroblastů a zlepšuje celulární motilitu v ráně [42]. Fibrinová hmota byla využita jako živná kultura pro pěstování keratinocytů a fibroblastů, prokazatelně vykazovala obdobné vlastnosti jako běžný kožní štěp. Fibrinový matrix byl testován jako vyhovující nosný systém pro exogenní růstové faktory, které mohou být v budoucnu využity k urychlení hojení ran [43].

Jako úspěšné substráty pro tvorbu matice pro vývoj buněk jsou využity hydrogely, jsou v nich míchány proteinové komponenty jako právě kolagen, fibrin či elastin. Právě díky jejich podobnosti k přírodnímu ECM. Architektury matrixu mohou být upravovány podle vlastností pevné složky substrátu či podmínkami houstnutí, nebo přidáním molekul, které indukují shlukování vláken. Při rekonstrukci tkáně laboratorně je nutné pomocí biopsie izolovat pacientovy buňky, především keratinocyty, melanocyty, fibroblasty a vaskulární endotelové buňky, ty jsou následně vpraveny do matrixu.

Dominantním průlomem je utváření fotopolymerizovatelných gelů užitím substrátů na bázi oxidu polyethylenu. Dalším výzkumem byla objevena jiná třída syntetických náhražek ECM, u které díky její homogenní struktuře je předpokládán omezení proteolytické přestavby buněk, příkladem je Matrigel. Tyto syntetické hydrogely jsou založeny na molekulách polyethylenglykolu (PEG). PEG působí jako vnitřní platforma, významný je díky své hydrofilitě a rezistenci k adsorpci proteinů.[41]

4.2 Dosavadní pokusy v tkáňovém inženýrství pokožky

Doposud úspěchem je vytvoření velmi jednoduché náhrady pokožky užitím populace buněk uvnitř pokožky. Vyjmuté autologní kreatinocyty a vysoce porózní, nebuněčný matrix z kolagenního matrixu byly testovány na prasečí pokožce, byly aplikovány in vivo. Během regenerace nastalo propojení štěpu a hostitelské tkáně, dále i vaskularizace. Potřebné množení buněk bylo pozorováno v průběhu 2 – 3 týdnů.

Na lidské tkáni pokusy proběhly in vitro, množení i vývoj buněk byly úspěšné. Později byly konstruovány krátkodobé (dočasné) dermo-epidermální náhrady kombinací neonatálních keratinocytů a fibroblastů na scaffoldu, ty jsou používány většinou na chronická poranění. Studie ukazují, že v případech užití těchto náhrad na chronické rány či vředy byla prokázána vysoká incidence uzavření ran. Také se klinický výzkum zabýval funkcí na popáleniny. Buňky získané biopsií z popáleného pacienta jsou soustředěny na substrát kolagenu kombinovaného s glykosaminoglykanem. Kultivace buněk probíhá 4 týdny po biopsii, poté je štěp připraven k transplantaci. Výsledky klinických experimentů ukazují dokonalejší přijetí štěpu i redukovánější výskyt jizev. Nicméně je nutné dalšími pokusy tyto výsledky potvrzovat.[9]

4.3 Problémy současně dostupných kožních náhrad

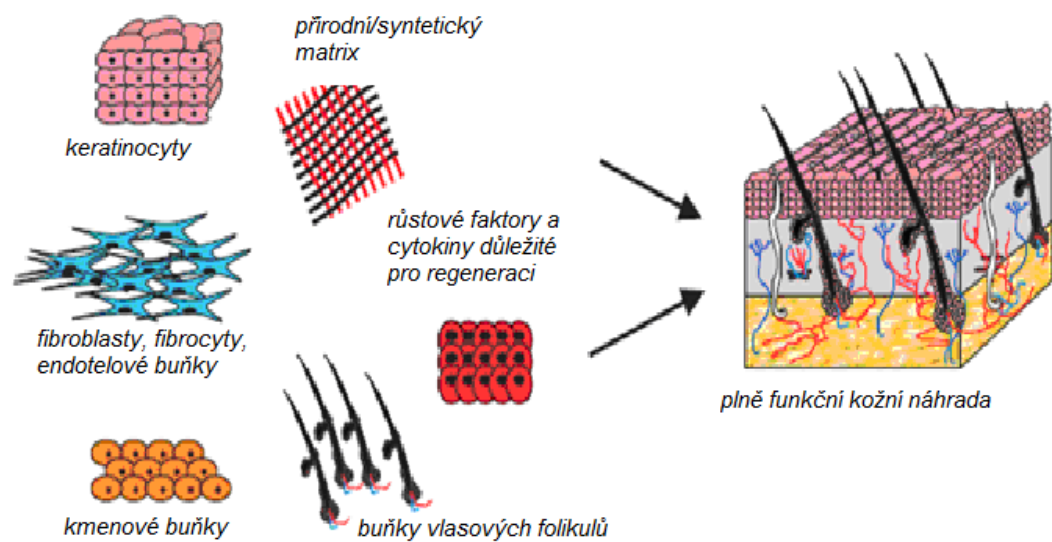
Hlavním tématem k řešení při aplikaci náhrady je proces jeho **vaskularizace**. Když je kožní štěp umístěn na ložisko rány, musí být tkáň plně krevně zásobená, podporuje uchycení štěpu a až díky tomu může probíhat plnohodnotná integrace s hostitelskou tkání. Některé existující kožní náhrady v tomto směru prosperují, po aplikaci samovolně nastává angiogeneze, ale jsou v tomto směru ještě prostory pro zlepšení, například v případech, kdy z neznámého důvodu není vaskularizace dostatečná. Opakované neúspěšné pokusy vhodného procesu vaskularizace uměle vytvořených kožních štěpů vedlo k obnovení úsilí prozkoumání možnosti revaskularizace autologních náhrad. Donedávna se vědci domnívali, že revaskularizace

autologního štěpu nastává buď přímou anastomózou mezi cévami štěpu a ložiska, nebo vrůstáním cév hostitelské tkáně do štěpu. Vědci nedávno dokázali, že prvotní krok revaskularizace odpovídá rané anastomóze mezi štěpem a hostitelskou tkání, především uvnitř centrální oblasti štěpu. [37]

Dalším problémem je **zjizvení** okrajů kožní náhrady. Je to jev negativně zasahující do funkčnosti, mechanického uspořádání tkáně i estetický problém. Například kožní jizvy jsou méně rezistentní vůči ultrafialovému záření, potní žlázy či vlasové folikuly se ve zjizvené tkáni již nevyvíjejí apod. Proto by následující generace kožních štěpů měla obsahovat technologii potlačující proces zjizvení. [10]

Nově vytvořená kožní náhrada je relativně jednoduchá jednovrstevná či dvouvrstevná struktura. Když je přijata hostitelem úspěšně, nabízí pak obdobné obranné funkce jako přirozená pokožka. Ovšem absence komplexnosti v porovnání s diferenciovanými strukturami přirozené pokožky je stále výrazná, což má dopad například na způsoby léčby této tkáně. Tuková vrstva současně dostupných implantátů nevykazuje izolační vlastnosti a není dostatečně krevně zásobená, implantáty postrádají pigmentaci, jsou necitlivé kvůli absenci nervových zakončení, neobsahují Langerhansovy buňky, které hrají hlavní roli v imunitě. I v této oblasti vývoje jsou již známy výrazné pokroky, které do budoucna přislubují řešení. [10]

Jeden z předpokladů konstruované tkáně je, že bude podporovat příslušnou buněčnou aktivitu, zahrnující například umožnění molekulových a mechanických signalizačních kaskád vyvolávajících hojení ran. Zároveň nesmí vyvolávat nežádoucí systémové odezvy, jako je například zánětlivá reakce. Hojení a dokonalá regenerace implantátu se prozatím jeví jako nejobtížnější úkol pro inženýrství. Proces regenerace tkáně je velmi složitý komplex právě kaskádových reakcí, podílí se na něm velké množství různých druhů buněk. Na tyto problémy musí být v budoucnu kladen větší důraz, než doposud.



Obr.6 – Schéma vytvoření plně funkční náhrady pokožky [10].

5 Tkáňové inženýrství a dodávání léčiv

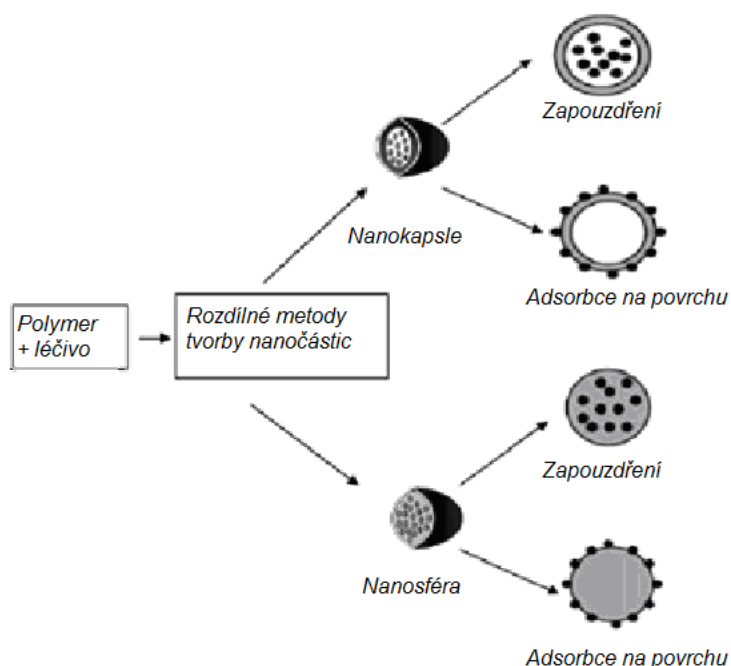
Další zaměření vývoje tkáňových substitutů je spojeno s možností dodávání léčiv přímo do tkáně či začlenění mikročástic a nanočástic léků přímo do vytvářené struktury. Cílem tkáňového inženýrství v obnovování poškozené tkáně a její funkčnosti je pochopení a zvládnutí tří základních struktur, jmenovitě buněk, scaffoldu a růstových faktorů, které na sobě vzájemně nemusí být simultánně závislé. Jak již bylo zmíněno, kvalitní scaffoldy musí poskytovat nejen adekvátní mechanickou podporu, ale také musí aktivně řídit a podporovat buněčné vazby, migraci, proliferaci a diferenciaci. Toho může být dosaženo, jestliže struktura bude schopna šířit či nahrazovat buněčné signály, tím i řídit buněčné funkce. [11, 44]

Cílené dodávání a prodloužení působení bioaktivních molekul je nezbytné k minimalizaci nežádoucích reakcí organismu, také svým konkrétním působením zkracuje dobu regenerace tkáně. Konstrukce nové tkáňové formace, která by plnohodnotně a úspěšně zastoupila prostorové, časové a funkční prostředí odpovídající ECM představuje nelehký úkol. V minulém roce vědci zaznamenali posun ve výzkumu v tomto směru, regenerační potenciál scaffoldu byl prudce vylepšen právě díky užití scaffoldu přímo uvolňujícího léky nebo inkorporací prostředků uvolňujících léčiva postupně. [45]

5.1 Využití nanočástic

Možností aplikace léčiv je jejich enkapsulace do polymerních nanočástic. Právě nanočástice poskytují kontrolované/nepřetržité uvolňování, jsou výjimečně výhodné díky svojí velikosti odpovídající velikosti buňky a biokompatibilitě s tkání. Kromě toho, tento nanomedikament je stabilní v krvi, netoxický, není trombogenní, nezánětlivý, úměrně blokuje retikuloendotelový systém, je použitelný pro různé druhy molekul jako léčiva, proteiny, peptidy či nukleové kyseliny. Využití nanočástic v protikladu s mikročásticemi je četné, mohou být transportovány v krevním řečišti, v němž se neusazují a neblokuje mikrocévky. Mohou kolovat v organismu a infiltrovat do tumorů,

kam mohou během procesu odstraňování nádoru dodávat medikamenty, či dodávat činidla pro přesné zobrazení zkoumané tkáně [13]. Základní syntéza a enkapsulace biodegradabilních nanomedikamentů je znázorněna na obrázku č. 7. Molekuly preparátu jsou buď navázány na povrch nebo zapouzdřeny dovnitř nanokapslí. [12]



Obr.7 – Typy biodegradabilních nanočástic:

Molekuly léčiv jsou zachyceny uvnitř nebo adsorbované na povrch [12].

5.2 Vývoj struktury

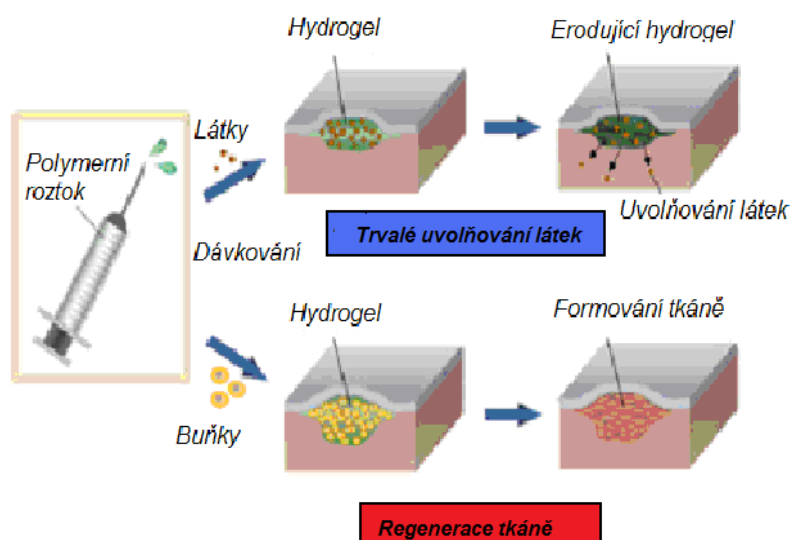
Poslední výzkum v oboru biomateriálů vhodných pro tento typ inženýrství byl řízen dle potřeby získat třídimenzionální strukturu designovanou dle vzoru přirozeného ECM. Za účelem napodobení vláknové struktury ECM bylo aplikováno několik mikrotechnologií a nanotechnologií zahrnujících zpěňování plynem, tvarování z pevné látky, struktury sestavené vlastní aktivitou molekul a nanočástic, elektrostatické zvlákňování. Jako biomateriály byly použity již v úvodu zmíněné polymery, konkrétně PLA, PLGA, PCL, z přírodních pak kolagen a fibrinogen. Na strukturách zhotovených těmito rozdílnými způsoby bylo pak testováno chování různých typů buněk, důraz byl

kladen na mechanismy, díky nimž buňky rozeznávají a dekodují topologické informace; nicméně to zatím zůstává velmi nejasné. [11]

5.3 Scaffoldy řízeně uvolňující léčiva

Syntetické ECM inspirované těmi biologickými by měly přenášet specifické buněčné vlastnosti, jako například podporování migrace periferních hostitelských buněk do scaffoldu. Lokální koncentrace a prostorově časový gradient molekuly závisí na jemné bilanci mezi transportem částic scaffoldu, navázání a rychlostí degradace molekuly a její rychlosti vývoje. Jestliže jsou tyto hodnoty známy, je potenciálně možné do scaffoldu vkonstruovat komplex staticky nebo dynamicky vyvážené distribuce relevantních biomolekul v předdefinovaném poměru. Nicméně hodnota gradientů a optimální časový rámec potřebný k vyvolání buněčné odezvy je prozatím neznámý.

Jedna z možností jak kontrolovat molekulární prostředí je užít scaffold jako bázi. Toho může být dosaženo inkorporací signálních molekul do tří dimenzionální struktury pomocí jejich samovolné disperze v matrixu nebo imobilizace způsobené elektrostatickou interakcí a následného kovalentního navázání do scaffoldu. [11]



Obr.8 – Aplikace hydrogelu pro biomedicínské využití [50].

5.4 Systémy dodávání látek v potencionálním zájmu tkáňového inženýrství

Dávkovací systém může být vyroben v různých tvarech (částice, implantáty), strukturách (rezervoár, matice) a z různých biodegradabilních a nebiodegradabilních materiálů poskytující možnosti uzpůsobení potřebného výdaje léčiv. Systém také musí zaručit adekvátní ochranu proti inaktivaci vlastního systému v biologickém prostředí a zaručit zachování bioaktivity v celém průběhu dávkování. Dodávání látek by mělo být časově řízené a kontrolovatelné. Některé strategie dávkování nabízejí možnost dodávat více než jeden protein v rozdílných předem stanovených poměrech.

Dále představím některé potencionální typy kontrolovaného dodávání látek.

5.4.1 Kontinuální dodávání

V následující kapitole představím různé typy systémů pro dodávání léčiv.

- ***Nebiodegradabilní systémy***

Původní systém kontrolované difúze založený na nebiodegradabilních polymerech, jako kopolymer acetátu ethylen-vinylu (EVAc) a silikony, byl prvně testován a užíván pro kontrolované uvolňování látek/léčiv. V současnosti je EVAc užíván pro tyto potřeby pouze ojediněle i přesto, že zkoumání jeho vlastností vedlo ke slibným výsledkům. [46]

V těchto systémech je transport látek (proteinů) ze struktury řízen koncentračním gradientem a limitován přítomností nerozpustné polymerové matice, která reguluje difúzi léčiv. Hromadný transport probíhající přes řetězce polymeru či póry je jedinou položkou procesu, která ho časově limituje. Rezervoár systému může být projektován tak, aby vykazoval minimální kinetické působení, dle potřeby biologické aplikace. Z tohoto pohledu, systémy založené na EVAc mohou být užitečné

kupříkladu v aplikacích, kde je potřebné výrazné a rychlé uvolňování růstových faktorů uvnitř scaffoldu při regeneraci tkáně. [47]

Zkušebně byla také aplikována pro účely dodání proteinů soustava silikonových trubiček. Nového způsobu dodávky a vlastností silikonových platform může být využito pro dlouhodobý vývoj a sloučení buněk. Tento systém byl specificky směřován pro zapouzdření buněk pankreatu zodpovědných za sekreci inzulinu (Langerhansovy ostrůvky). Výhledově užití těchto systémů pro jiné látky než peptidy a proteiny nabízí možnosti znovuoobnovení funkčnosti orgánů a tkání.

- **Biodegradabilní systémy**

Nynější studie jsou zaměřeny na vývoj rozpustných/biodegradabilních systémů nevyžadujících následné chirurgické odstranění po splnění funkce. Pozornost byla zaměřena na polymery PLA a PLGA a to právě díky jejich excelentní biokompatibilitě, chemické struktuře a molekulární hmotnosti. Zapouzdření proteinů uvnitř PLGA je považováno za významný postup působící jako ochrana biologické aktivity labilních makromolekulových léčiv a udržení jejich dlouhodobého uvolňování. Na trhu jsou již úspěšně využívány různé preparáty z PLGA pro účely uvolňování proteinů (konkrétně Lupron Depot®, Sandostatin LAR® Depot, Nutropine Depot® a Zoladex®).

Díky mimořádným vlastnostem byla do tohoto výzkumu užita také jiná skupina biodegradabilních polymerů, nová generace poly(ortho-ester) (POE) [48]. Byly zařazeny díky viskózním vlastnostem a nízké teplotě tání, kdy látky mohou být inkorporovány prostým vmísením za běžné teploty a může se s nimi pracovat za teploty kompatibilní s biologickou aktivitou proteinů. Polotuhé a tuhé struktury z POE byly shledány jako vysoce flexibilní a tvarovatelné matice vhodné pro kontrolované dodávání léčiv.

5.4.2 „On–off“ dodávání

Dodávka látek může být konstruována tak, aby probíhala ne kontinuálně, ale v určitém režimu pravidelného opakování. To nazýváme právě „on-off“ systém neboli systém přerušované dodávky.

- ***Programovaná dodávka***

V režimu plánovaného dodávání látek je uvolňování kompletně ovládáno vnějším mechanismem. Systém vymývající povrch může být konstruován tak, aby dosáhl pulzního dodávání lehkou modifikací kompozice konstrukce, která může být zhotovena z PGLA či hydrogelů. Princip systému je implantát obsahující střídavě vrstvu léčiv a izolace spojené tmelem. Tento implantát může být zhotoven v různých tvarech a je schopen dodávat i více než jednu látku. Navíc množství medikamentu může být jednoduše přizpůsobeno konkrétní potřebě upravením rozměru vrstev. [11]

- ***Spouštěný systém***

V těchto systémech je uvolňování řízení změnami ve fyziologickém prostředí implantátu nebo externím podnětem (změny teploty, elektrické či magnetické pole, ultrazvuk).

Nejzajímavější třída samoregulovatelných systémů pro využití v tkáňovém inženýrství je reprezentováno modifikovanými hydrogely, které jsou schopné odezvy na specifické fyziologické stimuly, jako je zvýšená hodnota glukózy nebo přítomnost speciálních proteinů či/a enzymů. [49] V tomto odvětví dochází k významnému rozvoji „inteligentních“ hydrogelů schopných identifikovat molekulu díky technice nazvané „otisk“, což znamená rozpoznání vlastností určité molekuly. Tato struktura může být designována ve formě vláken, gelu, plochy či mikročástic tvořících scaffold. [11]

PRAKTICKÁ ČÁST

6 Současný vývoj v oblasti nanovláken

Současný výzkum na KNT v této oblasti je ve spolupráci s Krajskou nemocnicí Liberec také soustředěn na vývoj krycích materiálů vhodných na rány zanícené, mokvající či produkující hnis. Problém současných materiálů je například ve vysoké přilnavosti s následným zarůstáním do rány, což při odstranění obvazu může způsobit znovuotevření rány. Požadavkem na tyto materiály je tedy snížená přilnavost, lepší biodegradabilita materiálu. Dále dnes již nutností je antibakteriální působení a vysoká savost materiálu. Níže představím současné druhy obvazových materiálů běžně užívaných v českých nemocnicích.

6.1 Krytí ran užívané v České republice

Hojení chronických ran vyžaduje speciální péči - zaměřenou na pacienta, hospodárnou a založenou na důkazech. Vlhké hojení ran poskytuje podmínky a prostředí vhodné pro přirozené hojení. Jsou vyvinuty techniky potřebné k péči o rány a napomáhající organismu vypořádat se s komplexním úkolem obnovy tkání. Pro každou fázi hojení je používán vhodný obvazový materiál, založený na různých technologiích. Moderní technologie využívají alginát s ionty stříbra, přináší účinné léčebné přípravky, které snižují množství bakterií v ráně, urychlují hojení a rychle odstraňují zápach.

6.1.1 Obvazy s alginátem

Obvazy s alginátem vápenatým (kalciumalginátem) se užívají na silně exsudující rány, udržují vlhké prostředí vhodné pro hojení ran. K procesu zgelovatění dochází na základě výměny iontů sodíku z ranného exsudátu s ionty vápníku z alginátu. Vlákná alginátu se sekretem rány se změní v nepřilnavý gel, snadno se odstraňuje z rány, tak nedochází k poškození nově vznikající tkáně. Jsou vyráběny z mořských řas. [21, 22]

6.1.2 Alginátové obvazy se stříbrem

Tyto obvazy mají silný antimikrobiální účinek a přitom udržují v ráně vlhkost. Alginátový matrix se stříbrem kombinuje antibakteriální působení iontů stříbra a absorpční schopnost kalciumalginátu a polyuretanové pěny. Ionizované stříbro se nachází na povrchu obvazu.

6.1.3 Antiseptická krytí

V těchto materiálech působí širokospektrální antiseptická složka. Vyrábí se ve formě krému nebo gázového polštářku, které obsahují kyselinu hyaluronovou (snižuje zánět a urychluje hojení ran) a sulfadiazin stříbrný (protibakteriální účinek, působí i proti určitým plísním). Na trhu je také obvaz impregnovaný mastí, která obsahuje 10% povidone-jodu. [21, 22]

6.1.4 Vysoce savé materiály

Hydrofilní vysoce absorpční krytí, je složeno ze tří vrstev - kontaktní perforovaná nepřilnavá vrstva, savé hydrocelulární jádro, selektivně propustný film (propouští plyny a vodní páry, nepropouští vodu a bakterie).

6.1.5 Obvazy s aktivním uhlím

Tento typ obvazových materiálů se uplatňuje u silně secernujících ran v době čištění a granulace, uhlí absorbuje sekret rány, redukuje zápach a ničí bakterie.

6.1.6 Hydrogely

Hydrogely mají zvláštní schopnost přizpůsobit se prostředí a mohou ránu buď hydratovat nebo naopak mohou z rány absorbovat exsudát. Gel vytváří v ráně vlhké prostředí, pomáhá jejímu čištění a odstraňování nekrotických částí i jiného

devitalizovaného materiálu. Běžně užívanými materiály v hydrogelech jsou purifikovaná voda, glycerol, želatinační činidlo či akrylátový polymer . [21, 22]

7 Představení výzkumu

Praktická část mé práce je cílena na vývoj nanovláknenné struktury, na které by mohl působit a prosperovat biologický materiál a tím byla vhodná pro následné pokusy týkající se právě pěstování biologického materiálu, na tom by pak dále mohlo probíhat testování působení různých antibakteriálních složek inkorporovaných do struktury nebo aplikovaných zevně. Konkrétní snaha v tomto směru je vytvořit agarový nanovláknenný scaffold s inkorporovanými nanočásticemi stříbra, popřípadě aktivního uhlí, na něm jako model biologické tkáně vypěstovat kolonie kvasinky pивní a testovat působení tohoto komplexu na bakterie, přičemž by se sledovalo chování kvasinek v závislosti na interakci mezi antibakteriální složkou a bakteriemi.

Jako testový materiál byly použity mikroorganismy kvasinky pивní, a to z důvodu, že laboratoř nanovláken TUL není prozatím přizpůsobena pro práci se složitějším biologickým materiálem.

Má práce nepřímo navazuje na bakalářskou práci Marcely Cudlinové (Fakulta textilní, TUL), která svým výzkumem zjistila, že kvasinky pивní přežívají proces elektrostatického zvlákňování; nanovláknenná struktura, se kterou pracovala, byl roztok agaru a PVA.

8 Materiály korespondující s výzkumem

8.1 Kvasinka pивní

Kvasinky jsou jednobuněčné houbové organismy. Rozmnožují se nepohlavně, charakteristické dělení je pro ně tzv. pučení (nové buňky vznikají z rodičovské buňky). Lidstvo využívá ve vinařství a pivovarnictví procesu látkové přeměny zvaného anaerobního alkoholového kvašení. Kvasinky vlastní enzymy, kterými přeměňují rostlinné sacharidy na ethanol a oxid uhličitý za vzniku tepla a energie. [20]

8.2 Agar

Agar je přírodní polysacharid. Má vysokou gelující schopnost, vyrábí se z červených mořských řas rodu *Floridaceae*. Taje při +96 °C a tuhne při +35 °C. V komerční podobě rozeznáváme agar slámkový a práškový.

Po celém světě je agar využíván jako živné médium pro kultivaci bakterií a hub, ale ne virů (nicméně viry jsou často pěstovány v bakteriích a ty jsou pěstovány na agaru). Ačkoli úspěšně je pěstováno méně než 1% existujících bakterií, základní substrát agarů může být používán pro kultivaci většiny známých mikrobů. Jsou dostupné i různé specifické druhy agarů cílené na diferencované potřeby mikrobů. [17, 18]

8.2.1 Základní druhy agarů jako kultivační půdy

1. Živný (masopeptonový) agar

Je to agar obohacený bujónem, pěstují se na něm nenáročné bakterie, obvykle se používá jako základ pro přípravu složitějších půd.

2. Krevní agar

Je nejpoužívanější pevnou půdou, vyrábí se přidáním beraních krvinek k chladnoucemu agaru (56°C). Je částečně také diagnostickou půdou, mohou se na něm projevit hemolytické bakterie.

3. Čokoládový agar

Vyrábí se obdobně jako krevní agar, beraní krvinky se ale přidávají za vyšší teploty (80°C), tím dojde k hemolýze, která také způsobuje ono čokoládové zabarvení. Tento druh živné půdy se používá k pěstování náročnějších bakterií.

4. Lewinthalův agar

Připravuje se stejně jako čokoládový agar, ale před nalitím na Petriho misku se přefiltruje přes jemný filtr, který zachytí cytoplazmatické membrány zhemolyzovaných krvinek. Tím se usnadní přístup bakterií k živinám, což podporuje lepší růst. Lewinthalův agar patří mezi nejvýživnější půdy. [19]

8.3 Poly-vinyl-alkohol (PVA)

PVA je polymer, který se nezískává z monomeru, vinyl-alkohol totiž neexistuje. Produktem reakcí, které by jej mohly potenciálně poskytnout, je acetaldehyd. Poly-vinyl-alkohol se vyrábí hydrolýzou poly-vinyl-acetátu. Proto obsahuje PVA jisté množství poly-vinyl-acetátových skupin, které tento polymer modifikují a způsobují jeho dosti proměnné vlastnosti.

PVA je bílý krystalický prášek. Jeho rozpustnost je závislá na obsahu nezhydrolyzovaného poly-vinyl-acetátu, na střední molekulové hmotnosti a na teplotě. Polymer s vyšší než pětiprocentním obsahem vinyl-acetátových jednotek se rozpouští ve vodě pouze při teplotách přesahujících 65°C. Jeho rozpustnost klesá se vzrůstající molekulovou hmotností. Je málo termoplastický, lze jej používat při teplotách od -50°C do 130°C, nad 200°C se rozkládá a vypařuje.

PVA se používá například v potravinářství pro přípravu želé, dále v chemickém průmyslu jako zahušťovadlo pro nátěrové hmoty, k výrobě lepidel a impregnačních hmot, které vykazují odolnost vůči benzinu, tukům, rozpouštědlům a olejům. Běžné výrobky z PVA jsou textilní vlákna, různá těsnění, hadice, obalové fólie či chirurgické nitě. [14]

8.4 Antibakteriální materiály

8.4.1 Stříbro

Stříbro je kov bílé barvy, je to chemický anorganický prvek, značí se Ag. Hustota stříbra je $10,5 \text{ g/cm}^3$, taje při teplotě 960°C , teplota varu je 1980°C . Mechanické vlastnosti tohoto prvku nejsou vysoké, proto jsou zlepšovány přidáním různých kovů. Stříbro je velmi tvárný kov, je možné vytepat tenkou stříbrnou fólii o šířce zlomku milimetru. Elektrická vodivost je významnou vlastností stříbra, je nejvyšší ze všech kovů (106 % vodivosti mědi). Stříbro na vzduchu neoxiduje, ztrácí však kovový lesk a tmavne, což je způsobeno reakcí se sirnými sloučeninami.

Stříbro se vyrábí z vlastních stříbrných rud, ve velkém rozsahu také z rud olova, zinku a mědi obsahujících stříbro. Mnoho stříbra se získává jako vedlejší produkt při hutnickém zpracování *stříbrnosného galenitu*. Využití stříbra je soustředěno hlavně do elektrotechnického průmyslu a do klenotnictví. Pro tyto aplikace se často využívají právě slitiny stříbra s mědí a jinými kovy (zinek, platina..), tím získává materiál vyšší tvrdost, pevnost a oteruvzdornost. (15,16)

Využívání antibakteriálních účinků stříbra je již světově rozšířeno. Ionty stříbra ovlivňují látkovou výměnu buněčného systému bakterií, potlačují dýchání a bazální metabolismus na elektronové úrovni a dopravu substrátu v buněčné membráně. Antibiotický a fungicidní účinek nanostříbra je dán jednak jeho přímým průnikem do bakterie, konkrétně jeho reakcí s -SH skupinami oxidačních metabolických enzymů bakterie a tím k jejímu udušení, jednak tím, že nanostříbro vytváří aktivní kyslík. Bakterie navíc nezískávají rezistenci vůči těmto kovům, což je výhoda proti klasickým antibiotikům. Česká společnost Nanotrade, s.r.o. produkuje širokou škálu speciálních výrobků s nanočásticemi stříbra využívajících právě těchto vlastností. Patří mezi ně například antibakteriální gel (dezinfekční prostředek pro vnější použití), antibakteriální sportovní prádlo či ponožky, moderní výrobek je také nanodeodorant na bázi nanočástic TiO_2 vhodný pro interiéry automobilů, v domácnostech, v místnostech se zářivkami (např. zdravotnické objekty). (23)

8.4.2 Antibiotika

Antibiotikum je organická látka zabraňující růstu mikrobů (bakteriostatická) nebo je hubící (baktericidní). Antibiotika likvidují mikroorganismy díky procesu, který se nazývá oxidativní stres. Při něm dochází k poškození DNA, v jehož důsledku hynou. [52]

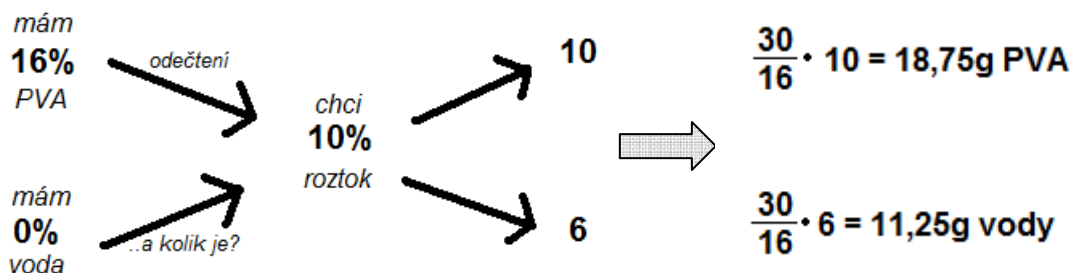
Současným trendem je předepisování antibiotik na nejrozumnější infekce, mnohdy zbytečně. Mikroorganismy způsobující infekce si na léky zvykají, dochází u nich ke změně genového fondu a stávají se proti antibiotikům rezistentními. Zvyšuje se tak riziko výskytu infekce, která nebude na léčbu antibiotiky vůbec reagovat. [53]

9 Příprava roztoku

Pokusem Marcely Cudlinové bylo zjištěno, že poměr agarů a čisté sušiny PVA roven 1:4 je pro zvláknění vyhovující. Po zkušném snížení tohoto poměru naředěním roztoku destilovanou vodou se průběh zvláknění ukázal rozdílný. Připravili jsme tedy čtyři roztoky, jejichž poměr agarů a sušiny PVA se postupně snižoval. Agar, který byl použit je WORT AGAR CM0248 pro laboratorní použití od firmy Oxoid. Pro přípravu roztoku mi byl poskytnut 16%-ní roztok poly-vinyl-alkoholu od firmy Novácké chemické závody, Nováky, Slovensko (molekulová hmotnost = 60 000 g/mol). Bylo tedy nutné ho dalším smísením s destilovanou vodou naředit do požadovaných hodnot. Postup a konkrétní hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 2. K určení hodnot použitých látek jsem použila výpočet takzvaným „křížovým pravidlem“ (Obr.9).

Tabulka 2 – Roztoky PVA a agarů.

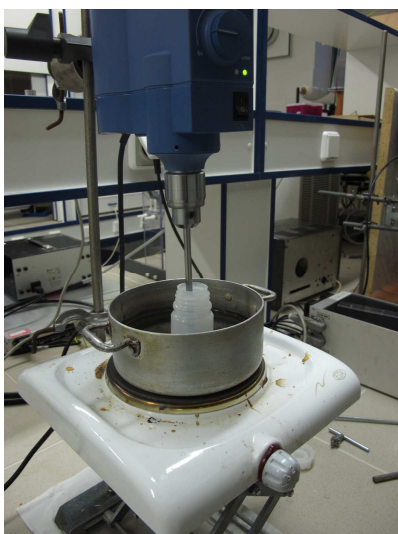
Označení roztoku	Hmotnostní koncentrace roztoku PVA	Příprava 30g roztoku			Poměr PVA / agar
		PVA 16%	Destilovaná voda	Agar	
<i>r1</i>	10,0%	18,8 g	11,2 g	0,5 g	4 / 1
<i>r2</i>	9,0%	16,9 g	13,1 g	0,5 g	3,6 / 1
<i>r3</i>	8,3%	15,6 g	14,4 g	0,5 g	3,32 / 1
<i>r4</i>	7,7%	14,4 g	15,6 g	0,5 g	3,08 / 1



Obr.9 – Křížové pravidlo: příklad přípravy 10%-ního roztoku PVA (30g).

9.1 Pracovní postup přípravy roztoku

Na mikrováze byla navážena požadovaná hodnota polymerního roztoku, poté ve správném poměru naředěno destilovanou vodou. Následně byl přidán agar. Roztok je postupně zahříván ve vodní lázni, dokud voda nedosáhne těsně pod hranici varu (Obr.10). Směs je nutno promíchávat. Agar v roztoku musí být zcela rozpuštěný.

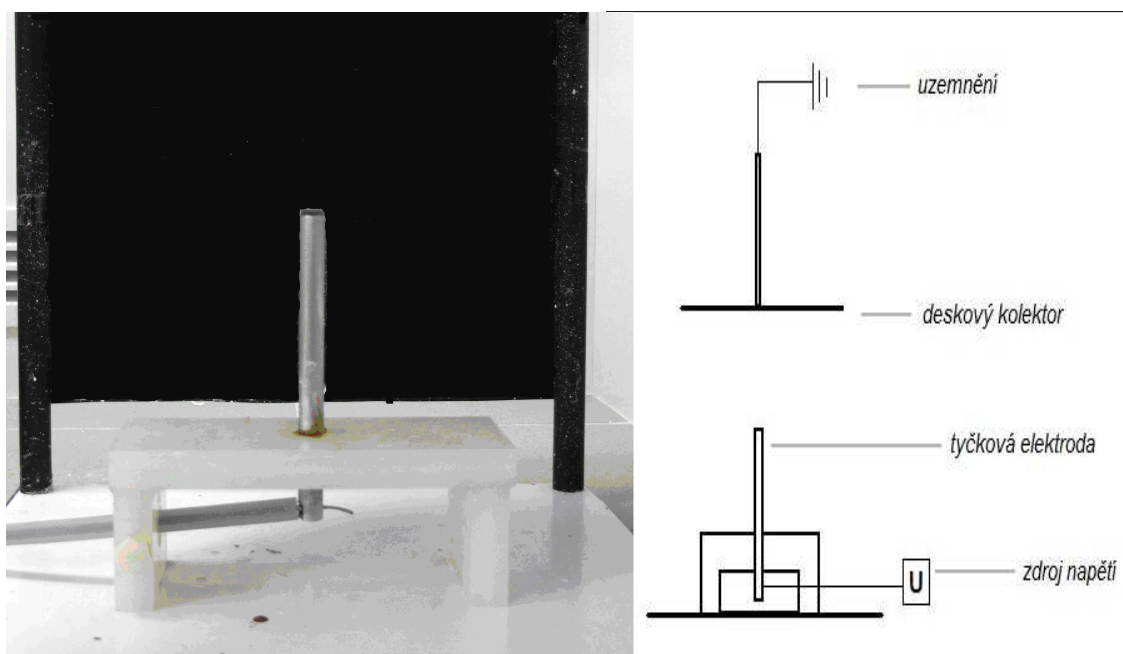


Obr.10 – Příprava roztoku ve vodní lázni.

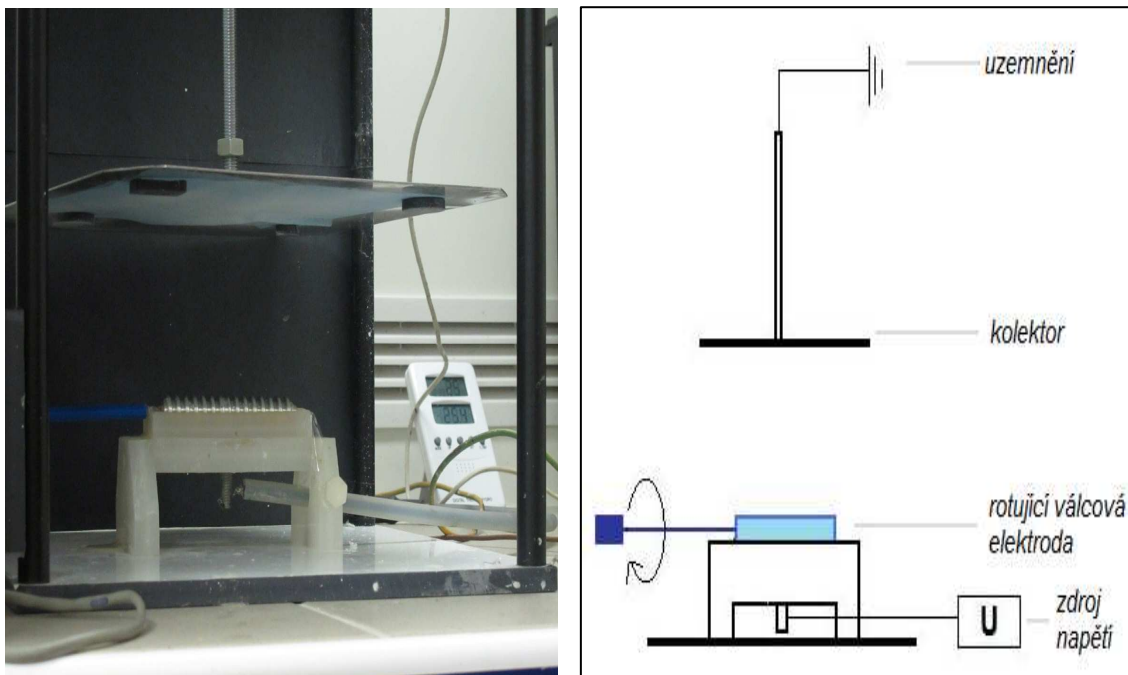
10 Elektrostatické zvlákňování roztoků

Komplexní proces elektrostatického zvlákňování je principiálně popsán v úvodu teoretické části této práce (viz kapitola 1.1).

Pro vytvoření vrstvy nanovláken byla zvolena soustava s tyčkovou elektrodou a rotujícím válcem typu Nanospider. Soustava pro elektrostatické zvlákňování je vždy složena z elektrody, na kterou je ze zdroje přivedeno vysoké napětí ($\sim \text{kV}$); v určité výšce nad elektrodou je připevněný vodivý kolektor s opačnou polaritou. Vzdálenost kolektoru přímo ovlivňuje samotný proces zvlákňování a vysychání vláken. Soustava s válcovou elektrodou navíc obsahuje ještě nádobu s polymerem a pohon pro rotaci válečku. Většinou jsou nanovlákná na kolektoru zachycována na speciální textilií Spunbond. Fotografie a schémata jsou znázorněná na Obr.11 a Obr.12. Celá soustava by měla být umístěna v digestoři, která se dá alespoň částečně odizolovat tak, aby ve vnitřním prostoru bylo možné regulovat teplotu vzduchu a vlhkost prostředí (pomocí klimatizace), oba tyto vnější podněty totiž zvlákňování výrazně ovlivňují.



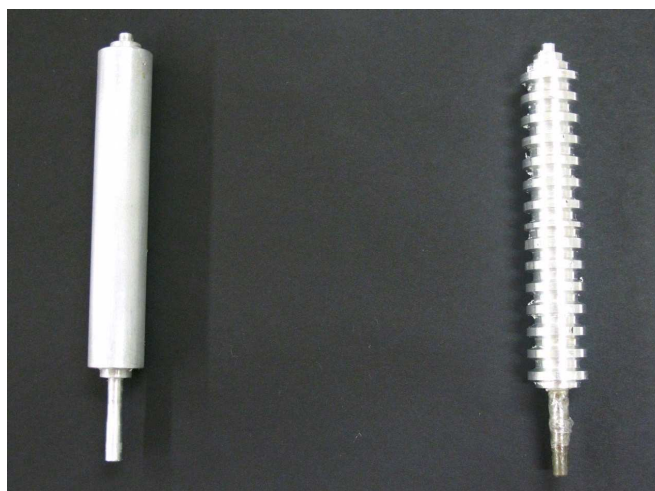
Obr.11 – Soustava na elektrostatické zvlákňování s tyčkovou elektrodou.



Obr.12 – Soustava na elektrostatické zvlákňování s válcovou elektrodou.

10.1 Zvlákňování na válečku

Pro vytvoření kompaktnější a silnější vrstvy nanovláken, která je vhodná pro cílené využití, jsme primárně zvolili zvlákňování na válečku. Pokusy proběhly na dvou typech hliníkových válečků – hladkém a modifikovaném (Obr.13). Procesy jsou podrobně popsány níže.



Obr.13 – Válečkové elektrody: hladká a modifikovaná, materiál hliník.

10.1.1 Zvlákňování roztoku *r1* na válečku

(Roztoky viz Tabulka 2)

I.

Typ elektrody:	hladký váleček
Vlhkost prostředí:	45 %
Teplota prostředí:	22,8°C
Vzdálenost kolektoru:	8cm

Při postupném zvyšování napětí dochází k jisté aktivitě roztoku a to v rozmezí dodávaného napětí 42kV – 48kV. Nicméně ke zvlákňování nedochází, na kolektoru se nevytváří vrstva nanovláken.

II.

Typ elektrody:	modifikovaný váleček
Vlhkost prostředí:	30 %
Teplota prostředí:	28°C
Vzdálenost kolektoru:	8cm

Modifikovaný váleček se prokazuje jako vhodnější. K procesu dochází za napětí 50kV, i když velmi neochotně. Kontinuální silnější vrstvu vytvořit nelze, vzorek je tak nekvalitní, že vrstvy nejsou pozorovatelné na mikroskopu. Při zvlákňování jsou jako stěžejní shledány hrany na povrchu válečku, právě z nichž dochází k tryskání roztoku. Je také nutné aplikovat velké množství roztoku, aby na válečku vznikala silná souvislá vrstva roztoku.

10.1.2 Zvlákňování roztoku *r4* na válečku

III.

Typ elektrody:	modifikovaný váleček
Vlhkost prostředí:	47 %
Teplota prostředí:	24°C
Vzdálenost kolektoru:	9cm

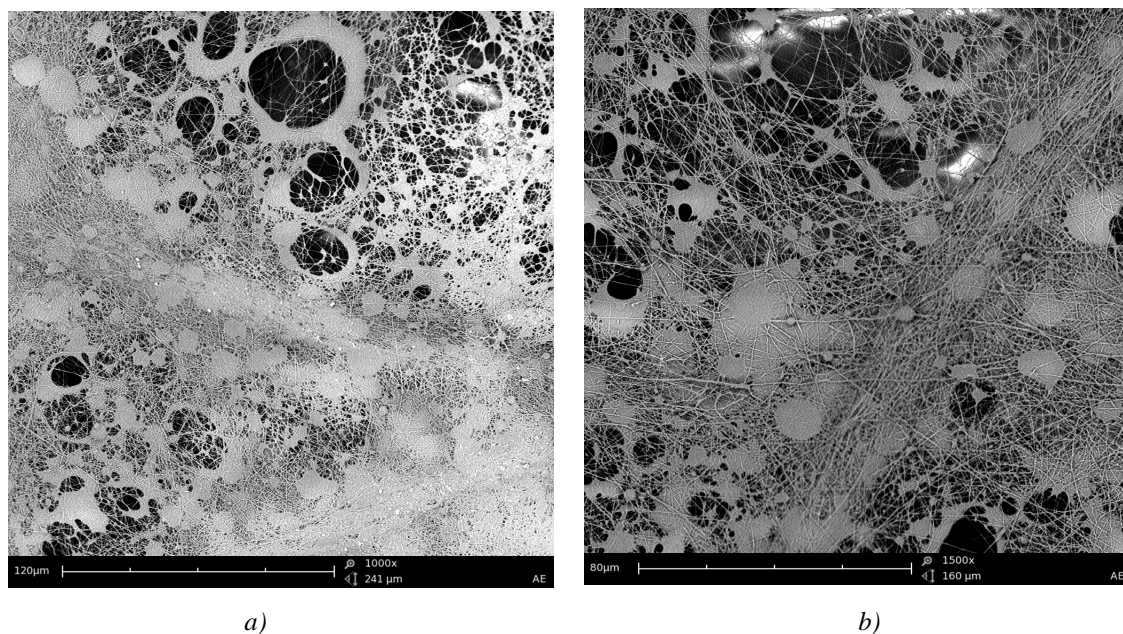
Zvlákňování vůbec neprobíhá, ani náznakem. Napětí bylo zvyšováno do 55kV, dále to již bylo dle předchozích zkušeností bezvýznamné.

10.1.3 Zvlákňování roztoku *r3* na válečku

IV.

Typ elektrody:	modifikovaný váleček
Vlhkost prostředí:	20%
Teplota prostředí:	32,8°C
Vzdálenost kolektoru:	9cm

Ke zvlákňování dochází při napětí 48,4kV, ale opět velmi neochotně. Pokus je opakován na hladkém válečku, kde je shledán obdobný výsledek. Nicméně vytvořila se jistá vrstva, která je pozorovatelná na optickém mikroskopu. Z obrázku Obr.14 je patrné, že vrstva je velmi nekvalitní. Je nesourodá, nekontinuální, z neznámých příčin dochází ke shlukování vláken či naopak k nezaplnění prostoru.



Obr.14 – Vrstva nanovláken z roztoku *r3*: a) zvětšeno 1000x, b) zvětšeno 1500x

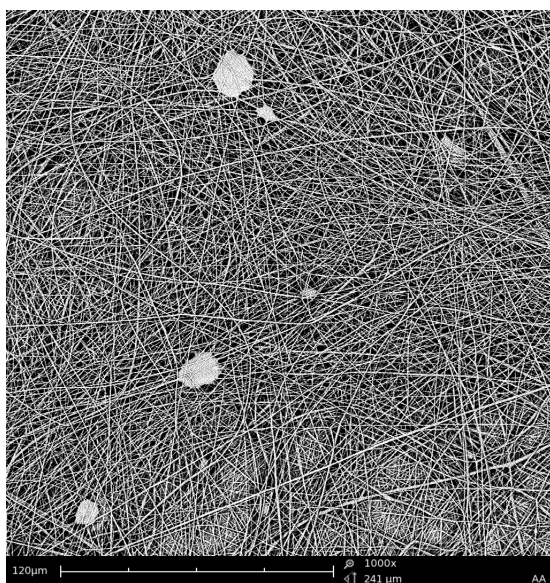
10.2 Zvlákňování na tyčce

Po zkušenosti se zvlákňováním daných roztoků na válečku, které se vykazuje jako velmi obtížné, bylo rozhodnuto, že tento způsob není vhodný, proto již další pokusy neproběhly a bylo přistoupeno ke zvlákňování na tyčkové elektrodě.

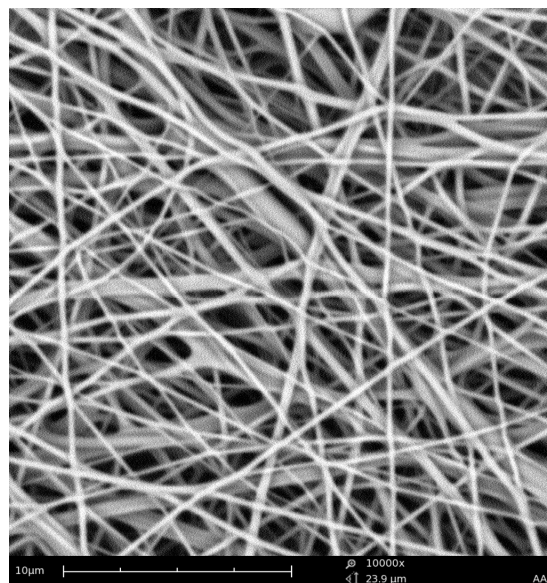
A.

Typ elektrody:	tyčka, průměr 0,8cm
Vlhkost prostředí:	25%
Teplota prostředí:	30,4°C
Vzdálenost kolektoru:	8cm

Zvlákňování všech čtyř roztoků proběhlo na tyčce hladce, nejsnáze zvlákňitelný se vykazoval roztok *r2*. Z fotografií vzorků je také patrné, že tato struktura obsahuje proti ostatním méně defektů. Proces nejkontinuálněji probíhal pod přivedeným napětím 19,8kV – 20kV. Na obrázcích číslo 15 - 18 jsou jednotlivé vzorky vrstev, fotografie byly pořízeny na elektronovém mikroskopu PHENOM, FEI Company a zpracovány na PC.

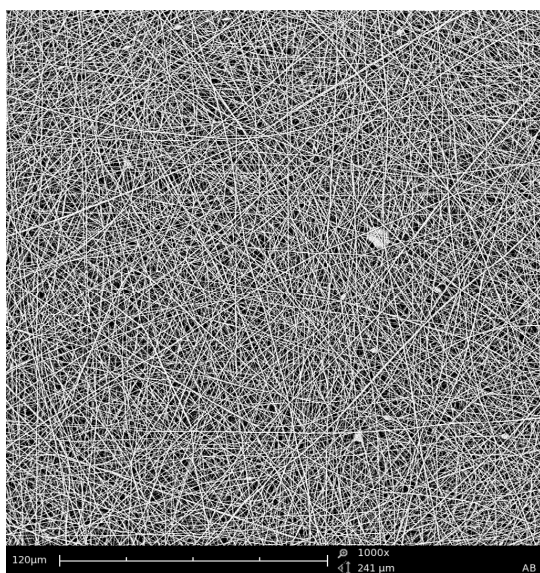


a)

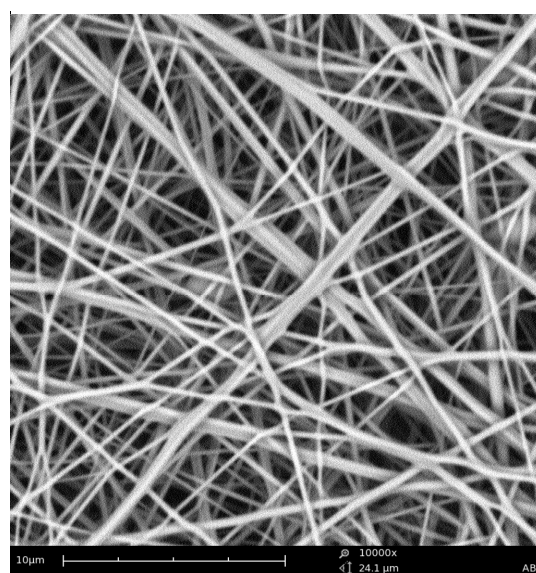


b)

Obr.15 – Vrstva nanovláken z roztoku r1: a) zvětšeno 1000x, b) zvětšeno 10 000x.

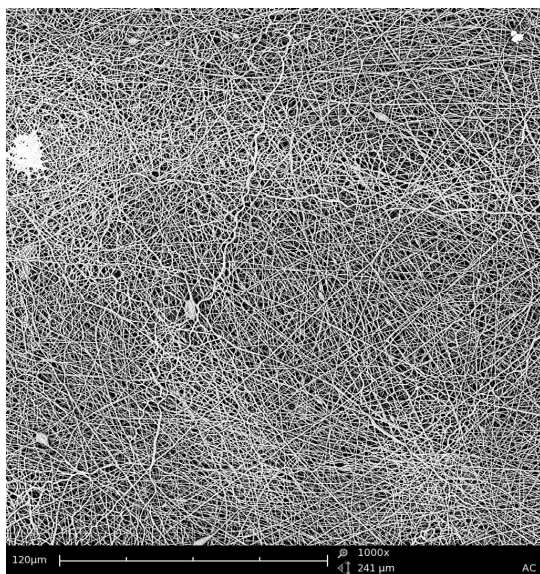


a)

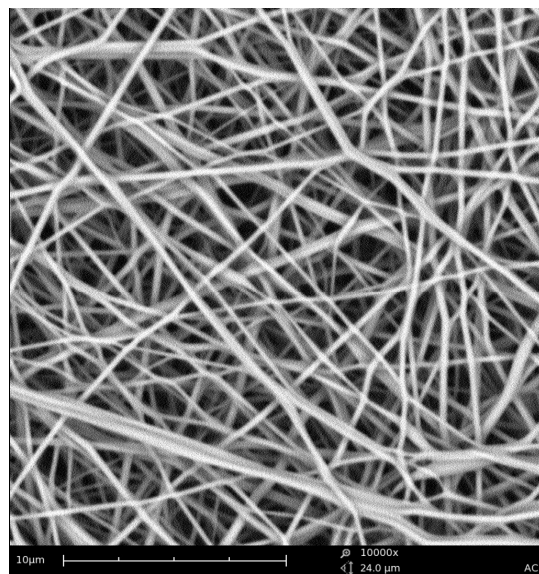


b)

Obr.16 – Vrstva nanovláken z roztoku r2: a) zvětšeno 1000x, b) zvětšeno 10 000x.

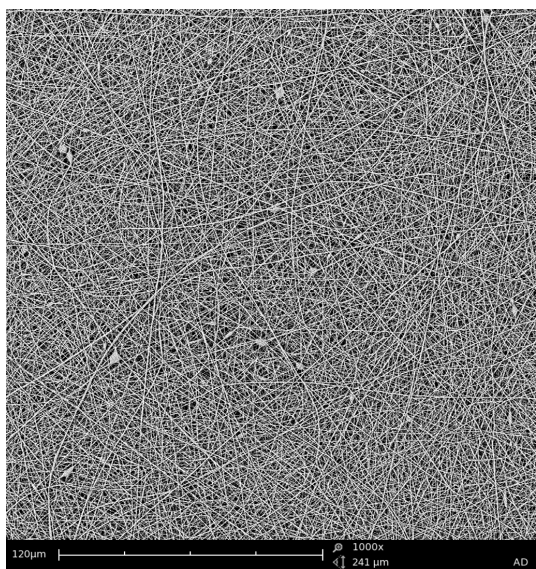


a)

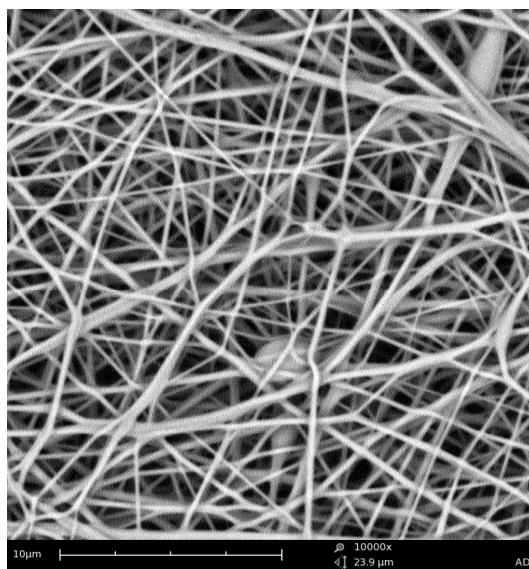


b)

Obr.17 – Vrstva nanovláken z roztoku r3: a) zvětšeno 1000x, b) zvětšeno 10 000x.



a)



b)

Obr.18 – Vrstva nanovláken z roztoku r4: a) zvětšeno 1000x, b) zvětšeno 10 000x.

11 Parametry zvlákňovaných polymerních roztoků

Proces zvlákňování je ovlivňován určitými vlastnostmi roztoku. Jsou to:

- Viskozita
- Teplota vypařování rozpouštědla (viz kapitola Polyvinylalkohol)
- Konformace polymeru
- Povrchové napětí

11.1 Viskozita

Viskozita je veličina charakterizující vnitřní tření a závisí především na přitažlivých silách mezi částicemi. Kapaliny s větší přitažlivou silou mají větší viskozitu, větší viskozita znamená větší brzdění pohybu kapaliny nebo těles v kapalině.

Definice viskozity zní:

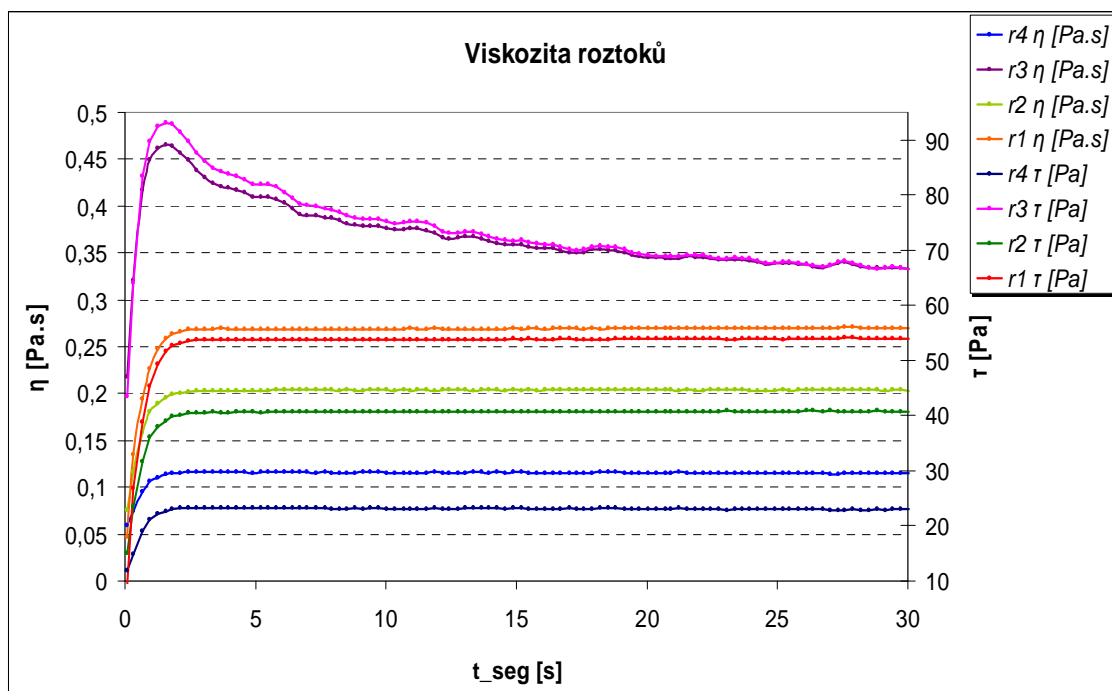
„Viskozita (vazkost) je fyzikální veličina, udávající poměr mezi tečným napětím a změnou rychlosti v závislosti na vzdálenosti mezi sousedními vrstvami při proudění skutečné kapaliny.“ [54]

η viskozita / součinitel viskozity; jednotka Pa.s (N.s.m^{-2})

τ tečné napětí; jednotka Pa (N.m^{-2})

$\varphi = 1/\eta$ tekutost

Graf viskozity je na Obr.19, průměrné hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 3. Měření bylo pro každý roztok opakováno třikrát, vyneseny jsou průměrné hodnoty. Z grafu je patrné, že hodnota viskozity roztoků klesá úměrně s jejich koncentrací. Výjimku představuje roztok r3, jehož viskozita nabývá nejvyšší hodnoty. Domnívám se, že pro roztok r3 nedošlo k dostatečnému rozpuštění agaru.



Obr.19 – Graf viskozity roztoků r1, r2, r3, r4

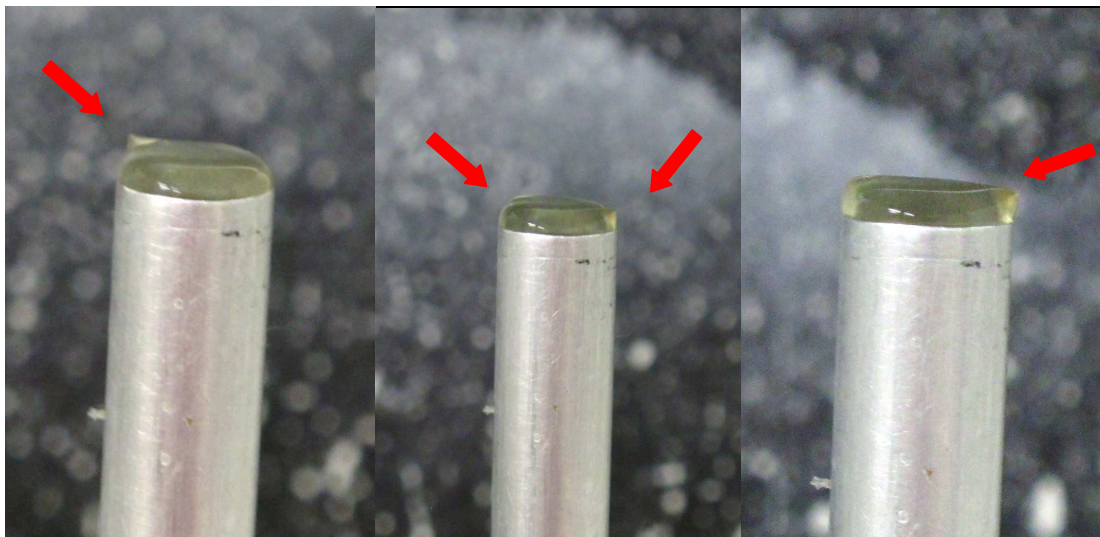
11.2 Povrchové napětí

Povrchové napětí je vlastnost kapaliny, kdy se povrch snaží dosáhnout co nejhladšího stavu s minimální plochou, tzn. stavu s co nejmenší energií.

Tento efekt je velmi důležitý při zvlákňování, ovlivňuje například, zda se dá roztok zvlákňovat z válečku, zda z hladkého nebo pouze modifikovaného apod. V našem případě byly pokusy na válečkách v podstatě neúspěšné, můžeme to přičítat právě vysoké hodnotě povrchového napětí roztoků. Další ukazatel k tomu směřující je fakt, že při zvlákňování na tyčce se Taylorovy kužely tvořily pouze po obvodu kapky roztoku, nikoli po středním povrchu. (Obr.20)

Hodnoty povrchového napětí všech čtyř roztoků jsou zaznamenány v Tabulce 3. Povrchové napětí bylo měřeno na přístroji Digital Tensiometer K9, Krüss GmbH. Povrchové napětí jsem pro každý vzorek měřila třikrát, vynesena je průměrná hodnota. Mezi hodnotami pro vzorek r1 a r2 je výraznější skok, což příkládám faktu, že i

koncentrace roztoků PVA se u těchto dvou vzorků liší nejvýrazněji. Dále jsou pak rozdíly hodnot povrchových napětí minimální.



Obr.20 - Taylorovy kužely po obvodu kapky

Tabulka 3 – Parametry roztoků a nanovláken

Roztok	Roztok PVA	Napětí při kterém zvlákňuje	Šířka vláken [nm]			Povrchové Napětí [mN/m]	Viskozita [Pa.s]
			Minimum	Maximum	Průměrná šířka		
<i>r1</i>	10,0%	20,0 kV	127,5	1161,9	281,10	47,7	0,27
<i>r2</i>	9,0%	20,0 kV	182,9	791,4	320,80	46,5	0,20
<i>r3</i>	8,3%	20,0 kV	157,2	575,8	303,90	46,4	0,36
<i>r4</i>	7,7%	19,8 kV	141,8	672,0	305,77	46,3	0,12

Závěr

Tkáňové inženýrství propojuje více vědních oborů. Vyžaduje specializaci v anatomii a fyziologii člověka, dále pak znalost fyzikálních dějů, fyzikálních a chemických vlastností látek. Proces konstrukce komplexu staticky a dynamicky vyváženého tak, aby co nejpřesněji odpovídal přirozenému prostředí a předdefinované funkci v organismu, je v dnešní době ve fázi vývoje a testování. Známé struktury či konkrétní materiály jsou zdokonalovány, alternativa je právě využití nanotechnologií.

Při procesu vývoje struktury pro testování biologického materiálu bylo dokázáno, že přidáním agaru do zvlákněvaného polymeru poly-vinyl-alkoholu se zvýší hustota roztoku. Při zvlákněvání koncentrace roztoku výrazně neovlivní samotný průběh, hodnoty napětí potřebné ke zvláknění zůstávají konstantní. Vytvořit silnější vrstvu materiálu je možné zvlákněním na tyčkové elektrodě, další eventualita je přepřavovací spinner, na kterém je testování ve fázi příprav. Pokusy zvláknit roztok proběhly také na válcové elektrodě typu Nanospider, avšak ukázaly se jako nevhodné. Zvlákněvání proběhlo velmi neochotně a vznikla nekvalitní a nesourodá vrstva nanovláken. Inkorporovat antibakteriální nanočástice a otestovat působení na biologický materiál se z časově náročné dostupnosti těchto procesů nepodařilo prozatím dokončit. Konkrétní snaha v tomto směru je vytvořit agarový nanovlákněný scaffold s inkorporovanými nanočásticemi stříbra, popřípadě aktivního uhlí, na něm jako model biologické tkáně vypěstovat kolonie kvasinky pivní a testovat působení tohoto komplexu na bakterie, přičemž by se sledovalo chování kvasinek v závislosti na interakci mezi antibakteriální složkou a bakteriemi. V tomto úsilí se bude pokračovat, až to vytíženost laboratoře a dostupnost materiálů umožní. Na konci tohoto projektu by měl být materiál využitelný ve zdravotnictví ke krytí ran, který podporuje regeneraci a vykazuje antibakteriální působení dokonaleji, než v současnosti dostupné prostředky.

Seznam obrázků

Obr.1 – a) nanovlákna, b) nanovlákna v porovnání s bavlněným vláknem

Obr.2 – Schéma principu elektrostatického zvlákňování

Obr.3 – Schéma stavby kosti

Obr.4 – Kostní tkáň

Obr.5 – Schéma pokožky

Obr.6 – Schéma vytvoření plně funkční náhrady pokožky

Obr.7 – Typy biodegradabilních nanočástic

Obr.8 – Aplikace hydrogelu pro biomedicínské využití

Obr.9 – Křížové pravidlo: příklad přípravy 10%-ního roztoku PVA (30g)

Obr.10 – Příprava roztoku ve vodní lázni

Obr.11 – Soustava na elektrostatické zvlákňování s tyčkovou elektrodou

Obr.12 – Soustava na elektrostatické zvlákňování s válcovou elektrodou

Obr.13 – Válečkové elektrody: hladká a modifikovaná, materiál hliník

Obr.14 – Vrstva nanovláken z roztoku r3

Obr.15 – Vrstva nanovláken z roztoku r1

Obr.16 – Vrstva nanovláken z roztoku r2

Obr.17 – Vrstva nanovláken z roztoku r3

Obr.18 – Vrstva nanovláken z roztoku r4

Obr.19 – Graf viskozity roztoků r1, r2, r3, r4

Obr.20 - Taylorovy kužely po obvodu kapky

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Materiály využívané v tkáňovém inženýrství pro konstrukci scaffoldů

Tabulka 2 – Roztoky PVA a agaru

Tabulka 3 – Parametry roztoků a nanovláken

Zdroje literatury

- [1] RŮŽIČKOVÁ, J. *Elektrostatické zvlákňování nanovláken*: Skriptum TUL, 2004. 65 s. ISBN 80-7083-867-1.
- [2] Jirsák, O. – Růžičková, J. – Lukáš, D. : Production of properties of Polymeric nanofibres, In: NANO 03
- [3] PHAM, QUYNH P.; SHARMA, UPMA; MIKOS, ANTONIOS G. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications. *TISSUE ENGINEERING* [online]. 2006, Volume 12, 5, [cit. 2011-03-29]. Dostupný z WWW: <www.thefutureisnear.org/student_research>.
- [4] VOKURKA, Martin , et al. *Velký lékařský slovník* . 8. vyd. : Maxdorf, 2009. 1144 s. ISBN 978-80-7345-166-0.
- [5] PLATT, David K. *Biodegradable polymers.*: Smithers Rapra Limited, 2006. 157 s. ISBN 1-85957-519-6.
- [6] LUKÁŠ, David; MARTINOVÁ, Lenka. *Lékařské textilie : 2. díl*. 1. Vyd. Praha : Asociace inovačního podnikání ČR, 2008. 248 s.
- [7] HUTMACHER, Dietmar W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* [online]. 2000, Vol. 21, 24, [cit. 2011-04-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [8] REZWAN, K., et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering : Review. *Biomaterials* [online]. 2006, Vol. 27, 17, [cit. 2011-04-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [9] BÖTTCHER-HABERZETH, Sophie; BIEDERMANN, Thomas; REICHMANN, Ernst. Tissue engineering of skin. *Burns* [online]. 2010, Vol. 36, 4, [cit. 2011-04-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [10] METCALFE, Anthony D.; FERGUSON, Mark W.J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J. R. Soc. Interface* [online]. 2007, 4, 14, [cit. 2011-03-29]. Dostupný z WWW: <<http://rsif.royalsocietypublishing.org/>>.
- [11] BIONDI, Marco, et al. Controlled drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, Volume 60, 2, [cit. 2011-03-29]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [12] KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar; YADAV, Subhash C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2010, Volume 75, 1, [cit. 2011-03-29]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [13] *Nanoshell.com* [online]. 3.4.2010 [cit. 2011-04-19]. Nanobiotechnology. Dostupné z WWW: <<http://www.nanoshel.com/research-center/index.php/nanobiotechnology-drug-delivery-and-tissue-engineering/>>.
- [14] Ducháček V.: *Polymery - výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 2. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. ISBN 80-7080-617-6.

- [15] VOJTĚCH, Dalibor. *Kovové materiály : Skriptum VŠCHT*. 1. Praha : Vydavatelství VŠCHT Praha, 2006. 185 s. ISBN 80-7080-600-1.
- [16] REMY, Heinrich. *Anorganická chemie : II. díl*. 2. Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1971. 831 s. ISBN 80-85427-38-9.
- [17] *Navajo : Otevřená encyklopedie* [online]. 2009 [cit. 2011-03-30]. Agar. Dostupné z WWW: <<http://agar.navajo.cz/>>.
- [18] KALINA, Tomáš; VÁŇA, J. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha : Karolinum, 2005. 606 s. ISBN 80-246-1036-1.
- [19] SMÍŠEK, Jan. *Mikrobiologie.unas : pro studenty 3. lékařské fakulty UK* [online]. 2009 [cit. 2011-03-30]. Obecná mikrobiologie. Dostupné z WWW: <<http://mikrobiologie.unas.cz/soubory/kultivace.pdf>>.
- [20] CAMPBELL, Neil A.; REECE, Jane B. *Biologie*. 1. Brno : Computer Press, a.s., 2006. 1332 s. ISBN 80-251-1178-4.
- [21] *Bbraun.cz* [online]. 2011 [cit. 2011-04-05]. Ošetřování kůže a ran. Dostupné z WWW: <<http://www.bbraun.cz/cps/rde/xchg/cw-bbraun-cs-cz/hs.xsl/products.html?level=0&id=00020741900002086963>>.
- [22] *Ikem.cz* [online]. 2006 [cit. 2011-04-11]. Léčba ran od A do Z. Dostupné z WWW: <<http://www.ikem.cz/www?docid=10591>>.
- [23] *Nanotrade.cz* [online]. 2008 [cit. 2011-04-11]. Produkty s antibakteriálními účinky. Dostupné z WWW: <<http://nanotrade.cz/produkty/produkty-s-antibakterialnimi-ucinky-2>>.
- [24] PETER, Roman. *Inovace.cz* [online]. 18. 12. 2008 [cit. 2011-03-24]. Nanotechnologie. Dostupné z WWW: <<http://www.inovace.cz/for-high-tech/nanotechnologie>>.
- [25] WAN-JU, Li, et al. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials* [online]. 2002, Vol. 60, Issue 4, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.10167/full>>.
- [26] PHAM, QUYNH P.; SHARMA, UPMA; MIKOS, ANTONIOS G. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications. *TISSUE ENGINEERING* [online]. 2006, Vol. 12, Num. 5, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <http://www.thefutureisnear.org/student_research/current_research/>.
- [27] LANGER, R., VACANTI, J.P. Tissue engineering. *Science* 260, 920, 1993.
- [28] PRICE, R.L., GUTWEIN, L.G., KALEIDIN, L., TEPPER, F., WEBSTER, T.J. Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography. *J. Biomed. Mater. Res. A* 67, 1284, 2003.
- [29] PATRICK JR CW, MIKOS AG, MCINTIRE. Prospectus of tissue engineering. In: Patrick Jr CW, Mikos AG, McIntire LV, editors. *Frontiers in tissue engineering*. New York, USA: Elsevier Science, 1998.
- [30] HOLLINGER JO, CHAUDHARI A. Bone regeneration materials for the mandibular and craniofacial complex. *Cells Mater* 1992;2:143}51.
- [31] HENCH LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991;74:1487–510.

- [32] LU HH, TANG A, OH SC, SPALAZZI JP, DIONISIO K. Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. *Biomaterials* 2005;26.
- [33] LOBEL KD, HENCH LL. In vitro adsorption and activity of enzymes on reaction layers of bioactive glass substrates. *J Biomed Mater Res* 1998;39.
- [34] XYNOS ID, EDGAR AJ, BUTTERY LDK, HENCH LL, POLAK JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276.
- [35] SUPP, D. M., BOYCE, S. T. 2005 Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin. Dermatol.* 23.
- [36] HUDON, V., BERTHOD, F., BLACK, A. F., DAMOUR, O., GERMAIN, L., AUGER, F. A. 2003 A tissue engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br. J. Dermatol.* 148, 1094–1104.
- [37] O'CEALLAIGH, S., HERRICK, S. E., BLUFF, J. E., MCGROUTHER, D. A. & FERGUSON, M. W. 2006 Quantification of total and perfused blood vessels in murine skin autografts using a fluorescent double-labeling technique. *Plast.Reconstr. Surg.* 117, 140–151.
- [38] *Zdravá pokožka* [online]. 2008 [cit. 2011-04-19]. Pokožka. Dostupné z WWW: <<http://www.zdrava-pokozka.cz/main.php?lang=cz&action=pokozka>>.
- [39] NAŇKA, Ondřej; ELIŠKOVÁ, Miloslava. *Přehled anatomie*. 2. Praha : Galén, 2009, s.416, ISBN 978-80-7262-612-0.
- [40] *KNT* [online]. 2011 [cit. 2011-04-19]. Věda a výzkum. Dostupné z WWW: <http://www.ft.tul.cz/depart/knt/nove/galerie/vyzkum_big/14.jpg>.
- [41] SELIKTAR, D., ZISCH, A. H., LUTOFF, M. P., WRANA, J. L. & HUBBELL, J. A. 2004 MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing. *J. Biomed. Mater. Res. A* 68, 704–716.
- [42] CURRIE, L. J., SHARPE, J. R. & MARTIN, R. 2001 The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast. Reconstr. Surg.* 108, 1713–1726.
- [43] GWAK, S. J., KIM, S. S., SUNG, K., HAN, J., CHOI, C. Y. & KIM, B. S. 2005 Synergistic effect of keratinocyte transplantation and epidermal growth factor delivery on epidermal regeneration. *Cell Transplant* 14, 809–817.
- [44] A.G.MIKOS, S.W. HERRING,P.OCHAREON, Engineering complex tissues, *Tissue Eng.* 12 (2006).
- [45] R.R. CHEN, D.J. MOONEY, Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering, *Pharm. Res.* 20 (2003).
- [46] W.R. WALSH, H.D. KIM, Y.S. JONG, R.F. VALENTINI, Controlled release of platelet-derived growth factor using ethylene vinyl acetate copolymer (EVAc) coated on stainless-steel wires, *Biomaterials.* 16 (1995) .
- [47] L. LEONI, T.A. DESAI, Micromachined biocapsules for cell-based sensing and delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004).
- [48] I. BALA, S. HARIHARAN, M.N. KUMAR, PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art, *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 21 (2004).

- [49] N.A. PEPPAS, P. BURES, W. LEOBANDUNG, H. ICHIKAWA, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000).
- [50] CHUNG, Hyun Jung; PARK, Tae Gwan. Self-assembled and nanostructured hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Nano Today* [online]. 2009, Vol. 4, Iss. 5, [cit. 2011-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [51] LENAU, Torben. *Biopolymers.net* [online]. 2003 [cit. 2011-04-20]. Material. Dostupné z WWW: <<http://www.designinsite.dk/htmsider/m0954.htm>>.
- [52] *Eurozprávy.cz* [online]. 2010 [cit. 2011-04-23]. Už víme, jak bakterie odolávají antibiotikům. Dostupné z WWW: <<http://veda-a-technika.eurozpravy.cz/veda/17688-novy-objev-uz-vime-jak-bakterie-odolavaji-antibiotikum/>>.
- [53] KOŽENÁ, Jana. *Zdravě.cz* [online]. 2009 [cit. 2011-04-23]. Co dokážou antibiotika. Dostupné z WWW: <<http://antibiotika.zdrave.cz/co-dokazi-antibiotika/>>.
- [54] LUBOMÍR, Sodomka, et al. *Základy fyziky pro aplikace : Díl první*. Liberec : ADHESIV, 2007. 313 s. ISBN 978-80-254-0153-8.